

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Московский государственный университет
имени М.В.Ломоносова»
Биологический факультет

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

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, член-корр. РАН,
Гусев Николай Борисович

Москва – 2018

Оглавление

Список сокращений.....	5
Введение	6
Обзор литературы.....	10
1. Белковый гомеостаз клеток. Система молекулярных шаперонов	10
2. Структура малых белков теплового шока.....	12
3. Шапероноподобная активность малых белков теплового шока.....	18
4. Малый белок теплового шока HspB1	21
4.1. Структура и функции малого белка теплового шока HspB1.....	21
4.1.1 Олигомерная структура HspB1 и ее регуляция.....	21
4.1.2 Взаимодействие HspB1 с другими представителями семейства sHsp.....	22
4.1.3 Функциональная активность HspB1	23
4.1.3.1 Участие HspB1 в регуляции актинового цитоскелета.....	23
4.1.3.2 Участие HspB1 в регуляции сборки микротрубочек и промежуточных филаментов ..	24
4.2. Участие HspB1 в процессах апоптоза.....	25
5. Малый белок теплового шока HspB1 и наследственные заболевания.....	26
5.1. Боковой амиотрофический склероз и мутации HspB1	26
5.2. Наследственная мотосенсорная невропатия или болезнь Шарко-Мари-Тута	27
5.3. Мутации в гене малого белка теплового шока HspB1 и невропатии периферической нервной системы.....	29
5.4. Возможные механизмы развития невропатий	33
6. Промежуточные филаменты.....	35
6.1. Структура промежуточных филаментов	35
6.2. Нейрофиламенты	37
Материалы и методы.....	40
1. Получение компетентных клеток E.coli и их трансформация	40
2. Получение плазмид, содержащих кодирующие последовательности исследуемых белков	40
3. Экспрессия белков.....	42
3.1. Экспрессия HspB1 дикого типа и его мутантных форм	42
3.2. Экспрессия белка легкой цепи нейрофиламентов.....	42
4. Выделение и очистка исследуемых белков.....	43
4.1. Выделение и очистка рекомбинантного HspB1 дикого типа и его мутантных форм.....	43
4.2. Получение других малых белков теплового шока	44
4.3. Выделение и очистка рекомбинантного белка легкой цепи нейрофиламентов.....	45
5. Методы исследования структуры и свойств белков	48

5.1. Ограниченный протеолиз	48
5.2. Спектральные методы исследования.....	48
5.2.1. Флуоресцентные методы исследования	48
5.2.2. Метод динамического светорассеяния	50
5.3. Методы изучения четвертичной структуры и белок-белковых взаимодействий	50
5.3.1. Метод аналитического ультрацентрифугирования	50
5.3.2. Использование метода гель-фильтрации и химического сшивания для изучения четвертичной структуры малых белков теплового шока и их способности образовывать гетероолигомеры.....	51
5.4. Исследование олигомерного состояния HspB1 дикого типа и его точечной мутантной формы с заменой R140G в клетках линии HEK293F	52
5.5. Исследование взаимодействия малых белков теплового шока с белком легкой цепи нейрофиламентов.....	54
5.5.1. Использование метода скоростного центрифугирования для анализа взаимодействия малых белков теплового шока с NFL.....	54
5.5.2. Электронная микроскопия	56
5.5.3. Модификация NFL пиренилмалеимидом и использование модифицированного белка для изучения кинетики полимеризации NFL	56
5.5.4. Фосфорилирование NFL цАМФ-зависимой протеинкиназой.....	57
5.5.5. Изучение взаимодействия малых белков теплового шока с NFL методом аналитического ультрацентрифугирования	57
6. Измерение шапероноподобной активности малых белков теплового шока	58
7. Моделирование структуры малых белков теплового шока	59
8. Некоторые аналитические методы	60
8.1. Спектрофотометрическое определение концентрации белков.....	60
8.2. Определение концентрации белка по методу Бредфорда	60
8.3. Электрофорез в денатурирующих условиях по методу Леммли.....	60
8.4. Электрофорез в присутствии мочевины по методу Перрье-Перри.....	61
8.5. Авторадиография.....	61
8.6. Western Blotting.....	62
Результаты исследования.....	63
1. Получение препаратов малого белка теплового шока HspB1 дикого типа и его точечных мутантов.....	63
2. Структура и свойства мутантных форм HspB1	66
2.1. Использование метода ограниченного протеолиза для исследования структуры белков.....	66

2.2. Анализ структуры HspB1 дикого типа и его мутантных форм спектральными методами.....	68
2.2.1. Влияние точечных аминокислотных замен на параметры собственной триптофановой флуоресценции.....	68
2.2.2. Использование флуоресцентной спектроскопии для исследования термической денатурации белков	70
2.2.3. Изучение гидрофобных свойств белков с помощью флуоресцентного зонда bis-ANS .	72
2.3. Четвертичная структура и белок-белковые взаимодействия в гомо- и гетероолигомерах малых белков теплового шока.....	73
2.3.1. Анализ четвертичной структуры HspB1 и его мутантных форм	73
2.3.2. Белок-белковые взаимодействия в гетероолигомерах HspB1 дикого типа и мутантной формы с заменой R140G	81
2.3.3. Белок-белковые взаимодействия в гетероолигомерах HspB1 с малым белком теплового шока HspB6	83
2.3.4. Влияние фосфорилирования на четвертичную структуру HspB1 дикого типа и его мутантных форм.....	88
2.4. Сравнение шапероноподобной активности HspB1 дикого типа и его мутантных форм ...	91
3. Взаимодействие малых белков теплового шока с белком легкой цепи нейрофиламентов	94
3.1. Выделение и очистка белка легкой цепи нейрофиламентов (NFL).....	94
3.2. Получение филаментов NFL in vitro.....	95
3.3. Влияние малых белков теплового шока на полимеризацию NFL	97
3.4. Определение стехиометрии связывания HspB1 с филаментами, образованными белком легкой цепи нейрофиламентов	100
3.5. Фосфорилирование тетрамеров и филаментов NFL цАМФ-зависимой протеинкиназой	101
3.6. Использование метода аналитического ультрацентрифугирования для анализа взаимодействия малых белков теплового шока с NFL	103
3.7. Изучение полимеризации с использованием NFL, модифицированного по единственному остатку цистеина пиренилмалеимидом (PM)	104
3.8. Изучение взаимодействия NFL с различными малыми белками теплового шока человека	106
Обсуждение результатов.....	108
Заключение.....	117
Выводы	119
Список литературы.....	120

Список сокращений

АА	– акриламид
а.к.	– аминокислота
а.о.	– аминокислотный остаток
БАС	– боковой амиотрофический склероз
БСА	– бычий сывороточный альбумин
Болезнь ШМТ	– болезнь Шарко-Мари-Тута
ДВМН	– дистальная врожденная моторная невропатия
ДМАПН	– 3-диметиламинопропионитрил
ДСН	– додецилсульфат натрия
МБА	– метилен-бис-акриламид
МЭ	– меркаптоэтанол
ПААГ	– полиакриламидный гель
ПСА	– персульфат аммония
ПФ	– промежуточные филаменты
ТЕМЕД	– тетраметилэтилендиамин
Трис	– трис(гидроксиметил)аминометан
ТХУ	– трихлоруксусная кислота
ЭГТА	– этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота
ФМСФ	– фенилметилсульфонидфторид
ACD	– α-кристаллиновый домен малых белков теплового шока
CaMKII	– Ca ²⁺ /кальмодулин зависимая киназа 2 типа
STD	– C-концевой домен малых белков теплового шока
Ig-подобный	– иммуноглобулин подобный
IPTG	– изопропил β-D-1-тиогалактопиранозид
HEPES	– 2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]этиленсульфоновая кислота
HEK293F	– культура клеток Human Embryonic Kidney 293
<i>HspB1</i>	– ген, кодирующий малый белок теплового шока HspB1
HspB1	– малый белок теплового шока HspB1
HspB1 WT	– белок HspB1 дикого типа
МАРКАРК2	– митогенаактивируемая протеинкиназа 2
MES	– 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота
<i>NEFL</i>	– ген, кодирующий белок легкой цепи нейрофиламентов
NFL	– белок легкой цепи нейрофиламентов
NFH	– белок тяжелой цепи нейрофиламентов
NFM	– белок средней цепи нейрофиламентов
NTD	– N-концевой домен малых белков теплового шока

Введение

Актуальность темы исследования

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 варибельным и, как правило, неупорядоченным N-концевым доменом (NTD) и коротким C-концевыми доменом (CTD). 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. Наличие α -кристаллинового домена обеспечивает формирование стабильных димеров малых белков теплового шока, которые могут ассоциировать и образовывать более крупные олигомеры. 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, экспрессия которых коррелирует с возникновением дистальной врожденной моторной невропатии (ДВМН) и болезни Шарко-Мари-Тута 2 типа (ШМТ2) – заболеваний характеризующихся прогрессирующим повреждением аксонов моторных и/или сенсорных нейронов. 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.

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, 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 MAPKAP 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 значимость исследования

В ходе исследования проведен детальный анализ физико-химических свойств четырех мутантных форм HspB1, наличие 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. Полученные данные могут быть полезными для понимания молекулярных механизмов возникновения и развития невропатий периферической нервной системы.

Апробация работы

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, включая 5 статей и 5 тезисов сообщений. Результаты работы были представлены 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).

Методы исследования

Препараты мутантных форм HspB1 были получены с помощью молекулярно-биологических методов. Для исследования структуры и физико-химических свойств мутантных форм HspB1 и взаимодействия малых белков теплового шока с белком легкой цепи нейрофиламентов были использованы разнообразные методы, такие, как гель-фильтрация, аналитическое ультрацентрифугирование, динамическое светорассеяние, электронная микроскопия, флуоресцентная спектроскопия, метод Western Blotting, а также ряд других методов. Клеточные линии HEK293F, стабильно синтезирующие HspB1 дикого типа и мутантную форму с заменой R140G, получали методом лентивирусной трансдукции.

Степень достоверности полученных результатов

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

Личный вклад автора

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.

Обзор литературы

1. Белковый гомеостаз клеток. Система молекулярных шаперонов

Процесс сворачивания (фолдинга) белковых молекул в нативное состояние включает в себя различные этапы и уровни и зависит от размеров белковой молекулы. Правильная упаковка некоторых (как правило, маленьких) белков происходит «автоматически» без каких-то дополнительных факторов, другим белкам для правильного фолдинга требуется помощь белков-шаперонов (другое название – белки теплового шока). Весь процесс фолдинга протекает в течение микросекунд и заканчивается формированием нативной конформации белка, характеризующейся минимальной свободной энергией. Несмотря на высокое разнообразие белковых структур, прослеживаются общие принципы их организации. К примеру, остатки гидрофобных аминокислот, как правило, расположены внутри белковой глобулы или в межсубъединичных контактах белковых комплексов [1]. Из-за мутаций, под действием различных стрессовых факторов или с течением времени белки могут приобретать ненативную конформацию или денатурировать. Подобные нарушения структуры опасны экспонированием гидрофобных аминокислот на поверхность глобулы, что приводит к слипанию белковых молекул и накоплению в клетках токсичных агрегатов. Накопление белковых агрегатов является достаточно распространенной причиной возникновения заболеваний, среди которых такие тяжелые патологии, как боковой амиотрофический склероз (БАС), болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, болезнь Александра и многие др. Поддержание белкового гомеостаза и нормальной жизнедеятельности клеток осуществляется системой белков-шаперонов. На основе молекулярной массы шапероны эукариот делят на следующие семейства: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 и sHsp (или HspB, малые белки теплового шока) [2]. Шапероны поддерживают белковый гомеостаз клеток на различных уровнях: от синтеза *de novo* до рефолдинга денатурировавшихся белков или их протеолитической деградации. Необходимым условием для функционирования шаперонов Hsp70, Hsp90, Hsp100 и шаперонинов семейства Hsp60 является гидролиз АТФ. Многокомпонентные белковые комплексы этих шаперонов обеспечивают сворачивание новосинтезированных белков и рефолдинг денатурированных. Для функционирования Hsp70 (в бактериях – DNAK) необходим ко-шаперон Hsp40 (в бактериях – DNAJ), который с одной стороны ускоряет гидролиз АТФ и высвобождение ренатурированного белка, а с другой – связывает субстрат, доставляя его к Hsp70. Ренатурированные субстраты высвобождаются из комплекса с шапероном, а неполностью ренатурированные субстраты либо подвергаются повторному циклу ренатурации, либо протеолизу, либо отправляются к другим белкам-шаперонам, в частности к шаперонинам

Hsp60 (в бактериях – GroEL и GroES). Шаперонины представляют собой очень большие белковые комплексы ~800-900 кДа со сложной четвертичной структурой. Среди субстратов шаперонинов были идентифицированы белки цитоскелета, такие как актин и тубулин. Белки семейства Hsp90 (в бактериях – HtpG) играют важную роль в регуляции внутриклеточного сигналинга. Субстратами Hsp90 являются многие протеинкиназы, транскрипционные факторы и рецепторы стероидных гормонов [3]. Димеры Hsp90 взаимодействуют с большим количеством разнообразных ко-шаперонов, обеспечивающих тонкую регуляцию их активности. Представители Hsp100 (у бактерий называются ClpB) используют энергию АТФ для разборки агрегатов денатурированных белков [4].

Представители семейства малых белков теплового шока (sHsp) относятся к АТФ-независимым шаперонам, которые связывают денатурированные белки и препятствуют их агрегации, проявляя таким образом свою шапероноподобную активность. В геноме человека обнаружено 10 генов, кодирующих sHsp (HspB1-HspB10, табл. 1). Отличительной чертой всех белков, входящих в это семейство, является наличие высоко консервативного α -кристаллинового домена (около 100 остатков), как правило, расположенного в центральной части молекулы этих белков [5].

Обобщая вышесказанное, можно заключить, что система поддержания белкового гомеостаза клетки состоит из различных взаимосвязанных частей, вместе обеспечивающих нормальную жизнедеятельность клетки.

Таблица 1. Представители семейства малых белков теплового шока человека.

Название	Другие названия	Номер в базе данных UniProtKB	Молекулярная масса мономера, Да	Тканевая специфичность
HspB1	Hsp25, Hsp27, Hsp28	P04792	22783	Повсеместно
HspB2	MKBP (myotonic dystrophy protein kinase binding protein)	Q16082	20233	Сердечная и скелетная мускулатура
HspB3		Q12988	16966	Сердечная и скелетная мускулатура
HspB4	α A-кристаллин	P02489	19909	Хрусталик
HspB5	α B-кристаллин	P02511	20159	Повсеместно
HspB6	Hsp20, p20	O14558	17136	Повсеместно
HspB7	cvHsp (cardiovascular heat shock protein)	Q9UBY9	18611	Сердечная и скелетная мускулатура
HspB8	Hsp22, H11 (protein kinase, product of E2IG1 gene)	Q9UKS3	21604	Повсеместно
HspB9		Q9BQS6	17486	Семенники
HspB10	ODF (outer dense fiber proteins)	Q14990	28366	Семенники

2. Структура малых белков теплового шока

Мономеры малых белков теплового шока включают в себя 3 домена (рис. 1А): центральный высоко консервативный Ig-подобный α -кристаллиновый домен (ACD, рис. 1Б), который фланкирован вариабельным и, как правило, неупорядоченным N-концевым доменом (NTD) и коротким С-концевыми доменом (CTD), состоящим из «хвостового» и С-концевого фрагментов, разделенных в некоторых случаях мотивом IXI [6, 7]. Динамичность четвертичной структуры малых белков теплового шока и подвижность N- и С-концевых доменов мономеров представляют трудности для кристаллизации sHsp. Тем не менее, на сегодняшний день с помощью кристаллографии установлены структуры Hsp16.5 археи *Methanococcus jannaschii* (PDB ID: 1SHS [8]), Hsp 16.9 пшеницы *Triticum aestivum* (PDB ID: 1GME [9]), Tsp36 плоского червя *Taenia saginata* (PDB ID: 2BOL [10]), StHsp14.0 бактерии *Sulfolobus tokodaii* (PDB ID: 2VQK [11]), XaHspA бактерии *Xantomonas axonopodis* (PDB ID: 3GT6 [12]) и HspB6 человека в составе комплекса с универсальным адаптерным белком 14-3-3 (PDB ID: 5LTW [13]). Помимо этого установлена трехмерная структура изолированных кристаллиновых доменов α В-кристаллина/HspB5 (PDB ID: 2WJ7) и HspB1 человека (PDB ID: 3Q9P), а также HspB6 крысы (PDB ID: 2WJ5) [6, 14]. sHsp человека образуют олигомеры различного размера: от димеров до крупных динамичных олигомеров [15]. Малые белки теплового шока человека HspB1 (Hsp27), HspB4 (α А-кристаллин) и HspB5 (α В-кристаллин) формируют многосубъединичные олигомеры с большой молекулярной массой [15, 16]. Другие представители семейства sHsp, такие как HspB6 (Hsp20) и HspB8 (Hsp22) человека, представлены преимущественно димерами (Hsp20) [17], или равновесной смесью димеров и мономеров (Hsp22) [18].

Структура α -кристаллинового домена sHsp. Образование димеров sHsp человека.

Доступные на сегодняшний день данные рентгеноструктурного анализа демонстрируют общие принципы строения sHsp. Центральный α -кристаллиновый домен sHsp представлен 7-8 β -складками (у растений, архей и бактерий – 8 β -складок, у млекопитающих – 7 β -складок (в результате объединения β 6 и β 7)), организованными в 2 β -листа (рис. 2А). α -Кристаллиновый домен обеспечивает формирование стабильных димеров малых белков теплового шока [6, 14]. Образование димера ACD малых белков теплового шока млекопитающих происходит за счет формирования серии водородных связей между антипараллельными β 7-складками двух мономеров (рис. 2А). У растений, архей и бактерий в формировании димера участвуют β 2 и β 6-складки соседних мономеров [19, 20].

Лагановским и соавт. были предложены 3 варианта расположения антипараллельных $\beta 7$ -складок соседних контактирующих мономеров: AP I, AP II и AP III с различной степенью перекрытия $\beta 7$ -складок [21] (рис. 2Б). Данные последних лет свидетельствуют о том, что ориентация AP II является наиболее распространенной и, вероятно, единственной, встречающейся в нативных условиях [13, 22]. При анализе структуры димера α -кристаллиновых доменов HspB5 (PDB ID: 2WJ7) в AP II ориентации было установлено, что в стабилизации межсубъединичных контактов участвует солевой мостик, образованный остатками R120 одного и D109 другого мономера α В-кристаллина (рис. 2А) [14]. В виду высокой степени гомологии между малыми белками теплового шока человека, считается, что аналогичные солевые мостики стабилизируют и димеры других представителей sHsp человека. К примеру, в структуре HspB1 остаток R140 одного мономера может взаимодействовать с D129 другого [23]. В ориентации AP II димер HspB1 симметричен относительно единственного остатка Cys137, расположенного в $\beta 7$ -складке. Вследствие чего возможно образование дисульфидной связи между цистеинами соседних мономеров [24-26]. α -кристаллиновые домены в составе димера располагаются под углом 121° относительно плоскостей ACD [27].

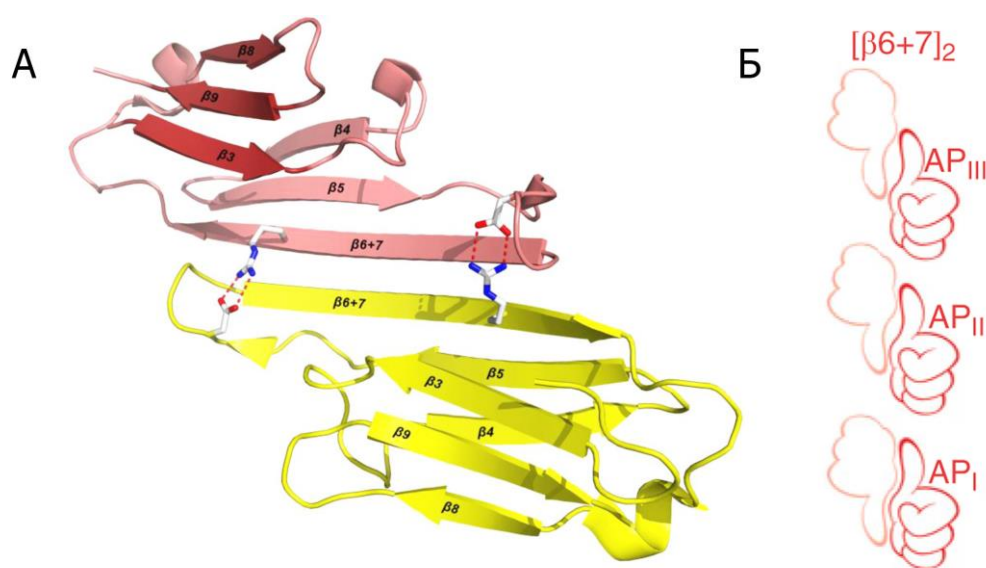


Рис. 2. А. Структура димера α -кристаллинового домена HspB5 (α В-кристаллин) человека. Мономеры контактируют антипараллельно расположенными $\beta 7$ -складками, формирующими серию водородных связей. Мономеры обозначены розовым и желтым цветом. Синим цветом обозначен остаток R120, красным цветом – остаток D109, пунктиром обозначен солевой мостик, образованный R120 и D109. Рисунок получен в программе PyMOL на основе структуры PDB ID: 2WJ7. **Б.** Варианты взаимного расположения (AP I, AP II, AP III) $\beta 7$ -складок мономеров в составе димера sHsp [7].

Структура высокомолекулярных комплексов sHsp человека. Для большинства малых белков теплового шока характерно образование динамичных олигомеров. В формировании олигомеров участвуют N- и C-концевые домены sHsp [28].

В C-концевом домене обнаружен так называемый IXI мотив (в ряде случаев представленный палиндромом, к примеру, ERTIPITRE у HspB5, рис. 1Б), который взаимодействует с гидрофобными аминокислотными остатками в канавке, образованной β 4 и β 8 складками α -кристаллинового домена соседнего димера [14, 22]. Ко-кристаллизуя комплекс ACD HspB1 (остатки 86–169) с пептидом C-концевого домена HspB1 (остатки 179–185, ITIPVTF), Хохберг и соавт. показали, что C-концевой пептид располагается в антипараллельной ориентации относительно β 8-складки [22]. Удаление C-концевой области (мотива IXI) у представителей sHsp некоторых бактерий приводит к диссоциации крупных олигомеров [29]. Однако для α A-кристаллина человека было показано, что удаление IXI мотива не сопровождается существенной диссоциацией крупных олигомеров [30]. Считается, что C-концевой домен ответственен за растворимость олигомеров sHsp. К примеру, в случае HspB1, его удаление, напротив, приводило к образованию олигомеров существенно большего размера, чем для полноразмерного белка [31]. Взаимодействие N-концевых доменов малых белков теплового шока необходимо для формирования крупных олигомеров. Это взаимодействие, по-видимому, обеспечивает расположенный в N-концевой области мотив WDPF, удаление которого приводит к диссоциации крупных олигомеров [31].

Ввиду сложной динамичной четвертичной структуры на сегодняшний день отсутствует атомная модель крупных олигомеров, образуемых HspB1 и α -кристаллинами (HspB4 и HspB5). Тем не менее, используя комбинации различных методов, были получены псевдоатомные модели четвертичной структуры α B-кристаллина [32, 33] (рис. 3). Модель Джейле и соавт. [32] основана на данных, полученных методами твердофазного ядерно-магнитного резонанса (ssNMR), малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS) и электронной микроскопии с негативным контрастированием. Модель Браун и соавт. [33] была получена комбинацией методов крио-электронной микроскопии и твердофазного ядерно-магнитного резонанса. Обе группы использовали метод химического сшивания с последующей масс-спектрометрией для подтверждения своих моделей. Для двух моделей характерны как общие свойства, так и некоторые существенные различия [34]. Олигомеры α B-кристаллина имеют сферическую форму с диаметром частиц 13,5 – 16 нм. Обе модели предполагают, что данные сферические олигомеры α B-кристаллина собраны из гексамеров («тример димеров») (рис. 3В).

Согласно модели Джейле и соавт. четыре гексамерных кольца образуют олигомер, состоящий из 24 субъединиц. При этом IXI мотивы C-концевых доменов взаимодействуют с

гидрофобной канавкой, образованной $\beta 4$ и $\beta 8$ складками α -кристаллинового домена соседнего димера. Структура N-концевого домена была получена на основе гомологии первичных структур HspB5 человека и ацетилксилаэстеразы *Thermotoga maritima* (PDB ID: 1V1Q) и подтверждена данными ssNMR. С помощью такого подхода в аминокислотной последовательности N-концевого домена были обнаружены две короткие α -спирали ($\alpha 1$ а.о.13-17; $\alpha 2$ а.о.24-36) и две β -складки ($\beta 1$ а.о.48-51; $\beta 2$ а.о.60-63) (рис. 3А). Участки, содержащие $\alpha 1$ и $\alpha 2$ спирали N-концевых доменов авторы располагают внутри полой сферы олигомера, полагая, что указанные участки взаимодействуют внутри этой сферы за счет гидрофобных взаимодействий (а.о. Leu32, 33, 37, Phe38). Петли, соединяющие $\beta 1$ и $\beta 2$ -складки, также взаимодействуют друг с другом, при этом $\beta 2$ -складка одного мономера в составе димера ACD имеет положение $\beta 2_{\text{intra}}$ и взаимодействует с $\beta 3$ -складкой того же самого α -кристаллинового домена, а $\beta 2$ -складка второго мономера в составе димера названа авторами $\beta 2_{\text{free}}$ и находится в свободном от ACD положении [32] (рис. 3А). Методом нативной масс-спектрометрии было установлено, что олигомер α В-кристаллина, состоящий из 24 субъединиц, составляет не более 5% от всей гетерогенной популяции олигомеров [35]. В связи с этим при получении вышеописанной модели 24-субъединичного олигомера Джейле и соавт. учли возможно достройки олигомера димерами α -кристаллиновых доменов вплоть до 36-субъединичного олигомера.

Вторая модель четвертичной структуры α В-кристаллина была предложена Браун и соавт. [33]. Авторы данной модели также выбрали в качестве основного типа олигомеров для получения псевдоатомной модели 24-субъединичный олигомер α В-кристаллина. Согласно данной модели олигомер также собран из гексамеров, что согласуется с более ранними данными [36]. Мономеры α В-кристаллина в составе димера могут находиться в двух конфигурациях: «распластанной» (M_e) и «изогнутой» (M_b) (рис. 3Б). N- и C-концевые домены в конформации M_e сближены друг с другом и находятся в одной плоскости с ACD. В конформации M_b N- и C-концевые домены удалены друг от друга, при этом N-концевой домен расположен под углом 55° к ACD (рис. 3Б). Поворот N-концевого домена в конформации M_b происходит за счет аминокислотных остатков E71-R74. Различное расположение имеют и C-концевые домены двух конформаций. CTD мономера в «распластанной» конформации образует внутримолекулярные контакты с NTD, в то время, как CTD мономера, представленного «изогнутой» конформацией, полностью экспонирован в водное окружение. Ассоциацию гексамеров в 24-субъединичный олигомер обеспечивают N-концевые домены N_e (рис. 3В). Данная псевдоатомная модель четвертичной структуры α В-кристаллина была получена для олигомера, содержащего 24 субъединицы. В тоже время, данный тип олигомеров составляет не более 30% всей популяции α В-кристаллина,

полученной методом крио-электронной микроскопии. Тем не менее, гексамерное строение олигомера, предложенное Браун и соавт. хорошо описывает структуру различных олигомеров α В-кристаллина (от 12-меров до 48-меров).

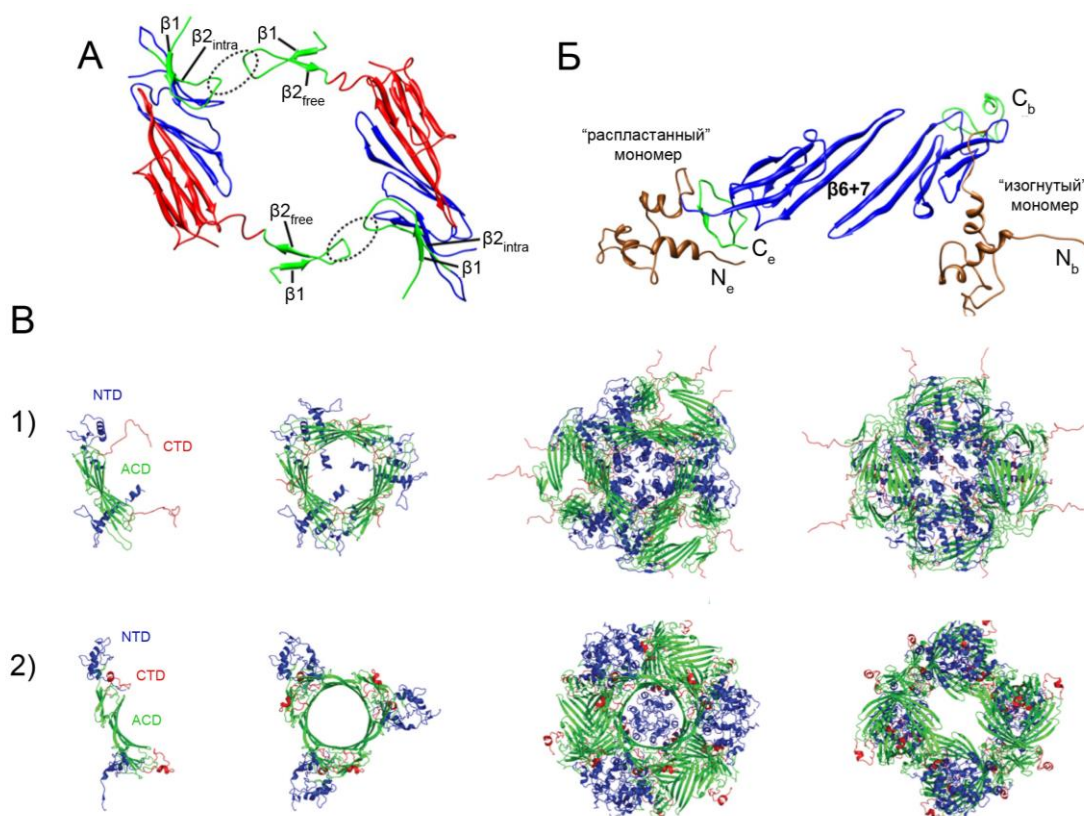


Рис. 3. А. Схема взаимодействия димеров в составе гексамеров HspB5 (α В-кристаллин) по [32]. Зеленым цветом обозначены N-концевые домены, синим и красным цветами – α -кристаллиновые домены соседних мономеров в составе димера HspB5. $\beta 1$ и $\beta 2$ – β -складки в составе N-концевого домена HspB5. Более подробное объяснение различий между β_{intra} β_{free} см. в тексте. **Б. Схема расположения N-концевых доменов соседних мономеров в составе димера HspB5 по [33].** C_e и N_e – C- и N-концевые домены «распластанной» конформации мономера (M_e); C_b и N_b – C- и N-концевые домены «изогнутой» конформации (M_b), соответственно. Синим цветом отмечены α -кристаллиновые домены, коричневым – N-концевые домены, зеленым – C-концевые домены (CTD). **В. Псевдоатомные модели олигомера малого белка теплового шока HspB5 (α В-кристаллин) человека по [34].** На панели 1) представлена модель [32], на панели 2) представлена модель [33]. Синим цветом отмечены N-концевые домены (NTD), зеленым – α -кристаллиновые домены (ACD), красным – C-концевые домены (CTD).

Вышеописанные псевдоатомные модели олигомеров α B-кристаллина демонстрируют общие принципы строения, такие, как гексамерное строение олигомера и неравнозначность мономеров в составе димера sHsp. В тоже время, имеются значительные различия, главным образом затрагивающие структуру и положение N-концевого домена. Обобщая все вышеописанное, можно заключить, что Джейле и соавт. предполагают, что N-концевые домены обращены во внутрь полости гексамерного кольца, где взаимодействуют своими $\alpha 1$ и $\alpha 2$ -спиралями, в то время, как Браун и соавт. располагают N-концевые домены на поверхности олигомера, особенно обращая внимания, что не выявили электронной плотности внутри олигомера. Тем не менее, обе модели позволяют описать строение не только 24-субъединичного олигомера, но и олигомеров, содержащих меньше (12-20) и больше (до 48) субъединиц.

Как уже было отмечено ранее, малые белки теплового шока представляют собой динамичные олигомеры. Вопрос механизма обмена субъединицами между олигомерами, позволяющего представителям семейства sHsp человека формировать гетероолигомеры, изучается давно. По современным представлениям, несмотря на то, что структурным элементом sHsp является димер, динамичность четверичной структуры и образование гетероолигомеров sHsp обеспечивается за счет диссоциации/ассоциации мономеров [25, 37].

3. Шапероноподобная активность малых белков теплового шока

Основной функцией малых белков теплового шока считается предотвращение агрегации белков, так называемая шапероноподобная активность. Агрегация белков может происходить по двум наиболее распространенным механизмам: аморфным (неупорядоченным) и амилоидным (высокоупорядоченным) путем [1]. Накопление агрегатов обоих типов представляет угрозу для жизнедеятельности клетки и часто приводит к развитию патологий (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, десмин-зависимая миопатия). Проявляя свою шапероноподобную активность, sHsp способны препятствовать появлению аморфных и амилоидных агрегатов в клетках. Малые белки теплового шока значительно повышают жизнеспособность бактериальных и эукариотических клеток после различных стрессовых воздействий. Так например, подавление синтеза Hsp16.6 в клетках цианобактерии *Synechocystis* приводит к их гибели после инкубации при повышенной температуре [38]. Функциональная активность малых белков теплового шока одного организма может проявляться даже в клетках организмов, относящихся к другому царству. К примеру, экспрессия HspB1 человека в клетках *E.coli* приводит к значительному увеличению выживаемости бактерий после теплового шока [39], а наличие в клетках *E.coli* малого белка

теплового шока IbpA микоплазмы *Acholeplasma laidawii* практически до 100% повышает выживаемость бактерий после длительного нагревания [40].

Малые белки теплового шока представляют собой динамичные олигомеры, четвертичная структура которых регулируется посттрансляционными модификациями, к примеру, фосфорилированием. Фосфорилирование Hsp27 (HspB1) приводит к диссоциации крупных олигомеров до димерных или тетрамерных форм [16]. Важность регуляции олигомерного состояния sHsp на сегодняшний день не вызывает сомнения (см. гл. 4.1.1). Воздействие высоких температур, окислительный стресс и другие неблагоприятные факторы приводят к увеличению фосфорилирования HspB1, что сопровождается диссоциацией олигомеров *in vivo* [41, 42]. В литературе до сих пор нет единого мнения о том, какая из олигомерных форм (крупные или мелкие олигомеры) sHsp функционально активна [1]. Согласно некоторым экспериментальным данным диссоциированная форма sHsp обладает большой шапероноподобной активностью, чем крупноразмерные олигомеры [43]. В тоже время другие экспериментальные данные противоречат этой точке зрения [44, 45]. Вероятно, обе точки зрения имеют право на существование. Можно предположить, что в условиях нормальной жизнедеятельности клетки крупные олигомеры малых белков теплового шока обладают достаточно высокой антиагрегационной активностью и взаимодействуют с определенным набором белков-мишеней, а в условиях стресса и при необходимости большего количества активных единиц, происходит индуцированная фосфорилированием диссоциация олигомеров, которые, вероятно, оказываются способными взаимодействовать с другим набором белков-мишеней.

С использованием различных модельных субстратов *in vitro* было показано, что малые белки теплового шока способны предотвращать аморфную агрегацию инсулина, родоназы, α -лактальбумина, цитратсинтазы, алкогольдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, лизоцима, F-актина и др. [15, 46-49]. Стоит отметить, что не все представители семейства малых белков теплового шока человека проявляют выраженную шапероноподобную активность. Так, HspB2, HspB3 и HspB7 практически не способны предотвращать агрегацию белков-субстратов [15].

Наиболее подробно шапероноподобная активность малых белков теплового шока человека изучена на примере α B-кристаллина (HspB5). Помимо вышеперечисленных субстратов α B-кристаллин способен препятствовать образованию фибрилл β -амилоида ($A\beta_{1-42}$), к-казена, α -синуклеина, аполипопроина C-II (apoC-II) *in vitro* [22, 50]. Предполагается, что в основе шапероноподобной активности sHsp лежат гидрофобные взаимодействия между малыми белками теплового шока и белками-субстратами [51, 52]. Гидрофобность α -кристаллина, измеренная с помощью флуоресцентного зонда bis-ANS, возрастает при

нагревании, при этом увеличивается антиагрегационная активность α -кристаллина [51]. В различных исследованиях предпринимались попытки картировать участки, ответственные за анти агрегационную активность. К примеру, для отдельных аминокислотных последовательностей α A-кристаллина (HspB4) и α B-кристаллина (HspB5) было показано, что участок $^{70}\text{KFVIFLDVKHFSPEITVK}^{88}$ в случае HspB4, и $^{73}\text{DRFSVNLDVKHFS}^{85}$ и $^{101}\text{HGKHEERQDE}^{110}$ в случае HspB5 самостоятельно проявляют анти агрегационную активность по отношению к $\text{A}\beta_{1-42}$ α -синуклеину и β 2-микроглобулину, хотя эта активность меньше аналогичной активности полноразмерных белков [53, 54].

Считается, что минимальной структурной единицей малых белков теплового шока, проявляющей шапероноподобную активность, является α -кристаллиновый домен [21, 22]. Изолированный α -кристаллиновый домен HspB5 так же, как и полноразмерный белок, эффективен в предотвращении аморфной агрегации α -лактальбумина и амилоидной агрегации к-казеина и $\text{A}\beta_{1-42}$. В условиях *in vivo* полноразмерный α B-кристаллин и его α -кристаллиновый домен до двух раз повышают выживаемость клеток HEK293 и HeLa в присутствии амилоида $\text{A}\beta_{1-42}$ [22]. В тоже время, наличие хотя бы небольшого участка C-концевой последовательности значительно увеличивает шапероноподобную активность. Так, шапероноподобная активность укороченного α B-кристаллина, содержащего аминокислотные остатки 68-162 сопоставима с активностью полноразмерного белка при предотвращении агрегации алкогольдегидрогеназы, в то время, как мутантная форма, содержащая только аминокислотные остатки 68-157, практически не обладает шапероноподобной активностью [21]. Зачастую для потери белком своей функциональной активности достаточно единичной аминокислотной замены. К примеру, а.к. замена R157H α B-кристаллина приводит к значительному снижению шапероноподобной активности белка. По-видимому, механизмы шапероноподобной активности sHsp в отношении аморфной и амилоидным типам агрегации различны. Известны примеры точечных а.к. замен (R120G α B-кристаллина), значительно снижающие активность белка в предотвращении аморфной агрегации субстрата, но практически не влияющие на активность по отношению субстратам, для которых характерна амилоидная агрегация [1].

Ввиду того, что различными группами исследователей для измерения шапероноподобной активности *in vitro* используются различные субстраты, способы индукции агрегации которых могут значительно отличаться (восстановление дисульфидных связей, повышение температуры), сравнение результатов, полученных в разных исследовательских группах, представляется сложной задачей. Своеобразное обобщение было проведено в недавно опубликованной работе Мымрикова и соавт., авторы которой провели детальное сравнение шапероноподобной активности десяти малых белков теплового шока

человека (HspB1-HspB10) с целым набором самых распространенных модельных субстратов [15].

Приведя общую характеристику семейства малых белков теплового шока, обратимся к подробному описанию структуры и свойств одного из представителей этого семейства, белку HspB1, являвшегося объектом нашего исследования.

4. Малый белок теплового шока HspB1

HspB1 (Hsp27) был впервые обнаружен в 1980 году, как белок с кажущейся молекулярной массой 27 кДа, экспрессия которого в культуре клеток HeLa увеличивалась в ответ на тепловой шок [55]. К настоящему времени показано, что синтез HspB1 возрастает в различных типах клеток не только в ответ на тепловой шок, но и при действии других неблагоприятных факторов [56]. HspB1 полностью соответствует основным критериям семейства малых белков теплового шока (табл. 1) и синтезируется повсеместно [57].

4.1. Структура и функции малого белка теплового шока HspB1

4.1.1 Олигомерная структура HspB1 и ее регуляция

Для малого белка теплового шока HspB1 характерно образование олигомерных комплексов с молекулярной массой от 200 до 800 кДа [16], состоящих из 19-40 субъединиц. Малый белок теплового шока HspB1 подвергается посттрансляционным модификациям. Основной модификацией, влияющей на структуру и функции HspB1, является фосфорилирование. В структуре HspB1 человека выявлено три участка фосфорилирования: Ser15, Ser78 и Ser82 [58]. В условиях *in vivo* основными ферментами, фосфорилирующими HspB1, являются MAPKAP киназы 2/3 [59, 60]. Фосфорилирование HspB1 MAPKAP киназой 2 сопровождается диссоциацией высокомолекулярных комплексов до олигомеров с молекулярной массой 60-120 кДа (тетрамеры или димеры) [16]. Мутантный HspB1 3D, содержащий три замены (S15,78,82D), имитирующей фосфорилирование по трем потенциальным участкам, по данным гель-фильтрации, электронной микроскопии и нативной масс-спектрометрии представлен исключительно малыми олигомерами [16, 43]. В ответ на воздействие стресса (тепловой шок) или добавление веществ, индуцирующих апоптоз, в клетках линии HeLa наблюдается увеличение степени фосфорилирования и вызванная этим диссоциация крупных олигомеров HspB1 [61].

При окислительном стрессе, моделируемом путем ишемии с последующей реперфузией изолированных сердец крыс, HspB1 может подвергаться S-тиолированию, сопровождающемуся образованием дисульфидной связи между Cys137 и глутатионом [62].

Модификация единственной SH-группы HspB1 приводит к диссоциации крупных олигомеров этого белка, причем указанный эффект сопоставим с эффектами, вызываемыми фосфорилированием. Высказывается предположение, что, S-тиолирование может также являться одним из дополнительных механизмов регуляции олигомерного состояния HspB1.

4.1.2 Взаимодействие HspB1 с другими представителями семейства sHsp

В живых клетках малые белки теплового шока могут быть представлены как гомо- так и гетероолигомерными комплексами. Наиболее известным примером таких комплексов, образующихся *in vivo*, является присутствующий в хрусталике глаза α -кристаллин, представляющий собой гетероолигомер, состоящий из α A – (HspB4) и α B (HspB5) – кристаллинов [63]. Кроме того в клетках обнаружены гетероолигомеры HspB1 с HspB6 и HspB5 [64]. В условиях *in vitro* HspB1 образует два типа комплексов с HspB6, которые по данным гель-фильтрации имеют кажущиеся молекулярные массы 90-150 и 250-300 кДа. Указанные комплексы содержат в своем составе эквимоллярные количества HspB1 и HspB6 [65, 66]. В формировании гетероолигомеров важную роль играют N-концевые домены малых белков теплового шока. Полноразмерные белки HspB1 и HspB6 с большей вероятностью образуют гетероолигомеры, чем мутантные укороченные формы HspB1 и HspB6, состоящие из изолированного α -кристаллинового домена или мутантные белки с отсутствующим N-концевым доменом [66]. Свойства гетероолигомеров малых белков теплового шока могут в значительной степени отличаться от соответствующих гомоолигомеров. К примеру, фосфорилирование HspB1 в составе гетероолигомера с HspB6 протекает существенно медленнее и не достигает уровня, характерного для гомоолигомера HspB1 [65]. Шапероноподобная активность гетероолигомерных комплексов sHsp, как правило, отличается от активности гомоолигомеров соответствующих белков. В опытах *in vitro* при использовании цитратсинтазы в качестве модельного субстрата шапероноподобная активность гетероолигомера HspB1-HspB4 была существенно выше, чем у гомоолигомера HspB1. При этом шапероноподобная активность гетероолигомера HspB1-HspB4 была меньше аналогичной активности гомоолигомера HspB4 [67]. Аналогичные результаты были получены и для гетероолигомеров HspB1-HspB5. Гомоолигомеры HspB5 эффективно предотвращали аморфную агрегацию α -лактальбумина и амилоидную агрегацию α -синуклина. В тоже время гомоолигомеры HspB1 проявляли очень низкую шапероноподобную активность в отношении данных субстратов. При этом гетероолигомеры HspB1-HspB5 предотвращали агрегацию обоих субстратов с эффективностью, сравнимой с таковой для гомоолигомеров HspB5 [68]. Известны примеры, когда шапероноподобная активность гетероолигомера не отличалась от таковой для гомоолигомеров указанных

белков, как в случае HspB1-HspB6 при использовании инсулина и F-актина в качестве субстратов [65].

4.1.3 Функциональная активность HspB1

Как уже отмечалось раньше, малые белки теплового шока полифункциональны и играют важную роль в различных процессах, протекающих в клетке. Это в полной мере относится к HspB1, экспрессируемому в больших концентрациях практически во всех типах клеток. В литературе собраны обширные сведения, свидетельствующие о том, что HspB1 играет важную роль в защите клеток от окислительного стресса, в предотвращении накопления агрегатов денатурированных белков, в регуляции активности ряда ферментов, а также в регуляции цитоскелета и процессов апоптоза. Остановимся более подробно только на двух последних физиологически важных свойствах HspB1.

4.1.3.1 Участие HspB1 в регуляции актинового цитоскелета

В начале 90-х годов Мирон и сотр., изучая ортолог HspB1 птиц (т.н. белок Hsp25), обнаружили, что этот белок может влиять на полимеризацию актина, кэпируя тупой конец актинового филамента [69]. Изучая механизмы взаимодействия Hsp25 мыши с актином, Виеске и соавт. обнаружили, что короткие пептиды, содержащие в своем составе участки полипептидной цепи Hsp25, ограниченные остатками W43-R57 и I92-N106, могут ингибировать полимеризацию актина *in vitro* [70]. Представленные экспериментальные данные позволили высказать предположение, что HspB1 может выступать в роли кэпирующего белка и, связываясь с «+» - концом актиновых филаментов, блокировать их полимеризацию. По мнению некоторых авторов ингибирующей активностью обладают нефосфорилированные мономеры HspB1 [71, 72]. Однако, учитывая особенности строения олигомеров HspB1, вероятность существования нефосфорилированных мономеров HspB1 не высока, тем более, что именно фосфорилирование по современным представлениям является основным способом регуляции олигомерного состояния HspB1 [43].

Вопрос о прямом влиянии HspB1 на полимеризацию актина до сих пор остается не вполне решенным. Это связано с тем, что помимо актина HspB1 способен связываться с различными актин-связывающими белками, такими как тропомиозин, кальпонин и кальдесмон, и, возможно, таким образом опосредованно влиять на процессы сборки/разборки актиновых филаментов [73]. Кроме того, в опытах *in vitro* HspB1 не был способен напрямую взаимодействовать с интактным актином, но образовывал прочные комплексы с частично денатурированным актином, проявляя свою шапероноподобную

активность [44, 74]. Таким образом, вопрос о том, влияет ли HspB1 на полимеризацию актина, нельзя считать окончательно решенным.

4.1.3.2 Участие HspB1 в регуляции сборки микротрубочек и промежуточных филаментов

Экспериментальные данные последних лет свидетельствуют о том, что HspB1 способен взаимодействовать с тубулином [75]. Присутствие HspB1 ускоряет полимеризацию микротрубочек *in vitro* [76]. Известно, что centrosомы, являются главными центрами организации микротрубочек в клетках животных. При этом оказалось, что экспрессия HspB1 в клетках культур HeLa и СНО сопровождалась выраженной не-centросомальной полимеризацией микротрубочек.

Помимо микрофиламентов и микротрубочек цитоскелет многих клеток содержит промежуточные филаменты, структура которых будет подробно описана в главе 6. Установлено, что HspB1 взаимодействует с такими белками промежуточных филаментов, как виментин [77], нестин и кератин-18 [78] и колокализуется с GFAP (глиальным фибриллярным кислым белком). При болезни Александра (Alexander disease (AxD)) наблюдается повышенная транслокация HspB1 на промежуточные филаменты. При этой болезни происходит точечная замена одной аминокислоты в GFAP, которая влияет на растворимость этого белка и приводит к образованию белковых агрегатов в астроцитах. Указанные агрегаты (фибриллы Розенталя) содержат в своем составе GFAP, виментин, HspB1 и HspB5 [79].

Данные литературы свидетельствуют о том, что для sHsp характерна специфичность взаимодействия с различными представителями семейства промежуточных филаментов. К примеру, HspB1 (в отличие от HspB5) не взаимодействует с десмином [80], но эффективно взаимодействует с другими представителями семейства белков промежуточных филаментов. Например, по данным Кайзера и соавт. [81] HspB1 эффективно ингибирует полимеризацию кератинов *in vitro*.

Все сказанное позволяет заключить, что HspB1 напрямую или опосредованно влияет на формирование всех элементов цитоскелета и таким образом может оказывать существенное влияние на жизнедеятельность клетки в нормальных и патологических условиях.

4.2. Участие HspB1 в процессах апоптоза

Благодаря наличию шапероноподобной активности, малые белки теплового шока способны увеличивать выживаемость клеток в условиях стресса. Однако, помимо непосредственной способности предотвращать агрегацию белков, представители sHsp участвуют в регуляции таких процессов, как апоптоз (HspB1) и аутофагия (HspB8) [5]. Один из путей инициации апоптоза состоит в активации специфических протеаз – каспаз, которые синтезируются в форме неактивных предшественников. При таком пути активации важная роль отводится цитохрому *c*. В состоянии покоя цитохром *c* находится в межмембранном пространстве митохондрий, однако при окислительном стрессе, воздействии радиации и в других неблагоприятных условиях цитохром *c* может выходить в цитоплазму через поры, образованные олигомерами белка Вах [82]. Попав в цитоплазму, цитохром *c* принимает участие в формировании апоптосомного комплекса, в состав которого входят Araf-1, прокаспазы-9 и dATФ [83]. Именно в таком комплексе происходит активация каспазы-9, которая, становясь протеазой, расщепляет неактивную прокаспазу-3 с образованием активной каспазы-3. Хаваси и соавт. установили, что увеличение синтеза HspB1 снижает образование апоптосом и способствует уменьшению количества активной каспазы-3 [82]. Как было отмечено ранее, для выхода и попадания в цитоплазму цитохрома *c* необходимы поры, образованные белком Вах. Регуляция активности Вах осуществляется Akt киназой и киназой гликоген-синтазы 3. Фосфорилирование, катализируемое Akt киназой, препятствует димеризации Вах и тем самым предотвращает образование пор, в то время как фосфорилирование киназой гликоген синтазы 3 β , приводит к активации Вах. Было установлено, что во время стресса HspB1 предотвращает инактивацию Akt киназы и усиливает взаимодействие между Akt и Вах, таким образом, блокируя образование пор, обеспечивающих транслокацию цитохрома *c*. При этом непосредственное взаимодействие между Вах и HspB1 не было выявлено. По некоторым данным HspB1 не только влияет на процесс транслокации цитохрома *c*, но способен напрямую связывать цитохром *c* и таким образом предотвращать процесс активации прокаспазы-9 [84], однако однозначных данных, подтверждающих непосредственное взаимодействие HspB1 и цитохрома *c*, в литературе нет.

Помимо вышеописанного пути инициации апоптоза, известен другой, так называемый, рецептор-опосредованный механизм инициации апоптоза. На начальных этапах происходит связывание FasL (лиганд) с Fas-рецептором (FasR). Посредством FasR реализуются два апоптотических каскада с различными адаптерными белками на начальных этапах. В первом случае взаимодействие FasL и FasR приводит к присоединению к рецептору адаптерного белка FADD, который может активировать каспазу-8 и запускать последующий каскад,

состоящий из каспаз-3, 6 и 7. Во втором случае, в роли адаптера выступает Daхх, и в реализации программы апоптоза участвуют протеинкиназы Ask, MAP и JNK. В физиологических условиях Daхх локализован в ядре, поэтому цитотоксический эффект Daхх связан с его транслокацией в цитоплазму клетки. Считается, что фосфорилированный димер HspB1 может взаимодействовать с Daхх как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*. Проникая в ядро, HspB1 блокирует транслокацию Daхх в цитоплазму, а в цитоплазме препятствует связыванию с FasR и с Ask киназой [85]. Насколько нам известно, в настоящее время нет данных о влиянии HspB1 на FADD-индуцированный механизм апоптоза.

5. Малый белок теплового шока HspB1 и наследственные заболевания

Малые белки теплового шока участвуют во многих внутриклеточных процессах, регулируют динамику цитоскелета, процесс автофагии, пролиферацию и дифференцировку клеток [5]. Вероятно, именно поэтому а.к. замены в sHsp зачастую коррелируют с возникновением врожденных заболеваний [23, 86, 87]. Мутации в генах малых белков теплового шока ассоциированы с возникновением различных наследственных заболеваний человека, таких как различные виды невропатий (HspB1, HspB3 и HspB8), миопатий (HspB3, HspB5) и наследственной катаракты (HspB4). На сегодняшний день известно более 20 мутаций *HspB1*, обнаруженных у больных невропатиями периферической нервной системы: болезнью Шарко-Мари-Тута 2 типа (ШМТ2, рис. 4), дистальной врожденной моторной невропатией (ДВМН) и боковым амиотрофическим склерозом (БАС).

5.1. Боковой амиотрофический склероз и мутации *HspB1*

Среди пациентов с БАС было выявлено 2 мутации *HspB1*: с.570G>C и с.610dupG [88]. Боковой амиотрофический склероз – неизлечимое заболевание, характеризующееся прогрессирующей потерей активности моторных нейронов [89]. В первом случае точечная мутация с.570G>C приводит к замене глутамина в положении 190 на гистидин (Q190H) в С-концевом домене HspB1. Вторая мутация (с.610dupG) сопровождается одновременно точечной заменой аминокислотного остатка аланина в положении 204 на глицин и последующим сдвигом рамки считывания, в результате чего синтезируется мутантный белок, содержащий дополнительно 6 аминокислот в С-концевом домене (p.Ala204Glyfs*6). Свойства мутантного HspB1 Q190H до сих пор не охарактеризованы, в тоже время от пациента с мутацией с.610dupG были получены лимфобластоидные клеточные линии, с использованием которых была показана повышенная склонность мутантной формы белка к

димеризации. Кроме это, в культуре клеток HspB1 Ala204Glyfs*6 проявляет меньшую шапероноподобную активность, чем белок дикого типа [88].

5.2. Наследственная мотосенсорная невропатия или болезнь Шарко-Мари-Тута

Периферические невропатии составляют разнообразную группу заболеваний нервной системы, наиболее распространенными из которых являются дистальная врожденная моторная невропатия (ДВМН) и болезнь Шарко-Мари-Тута (ШМТ) или наследственная мотосенсорная невропатия. Клинические и электрофизиологические данные свидетельствуют о том, что у больных вышеперечисленными заболеваниями наблюдаются прогрессирующая мышечная слабость и зачастую возникают проблемы с передачей нервных импульсов по периферической нервной системе [90]. При болезни ШМТ поражаются и моторные и сенсорные нейроны, в то время как при ДВМН повреждаются только моторные нейроны. В связи с отсутствием точного разделения этих заболеваний некоторые авторы склонны считать ДВМН моторной формой заболевания ШМТ. По средним оценкам распространенность невропатий Шарко-Мари-Тута составляет 1 на 2500 обследованных, однако генетические изменения и клинические проявления сильно различаются в каждом индивидуальном случае: от патологий в функционировании Шванновских клеток до нарушений в гомеостазе самих нейронов. На основе электрофизиологических проявлений заболевание ШМТ подразделяют на несколько обширных классов, каждый из которых имеет несколько подтипов. В основе классификации лежат различия в скорости проведения импульса по нервному волокну (в норме эта скорость составляет 40-50 м/с) и тип наследования заболевания (табл. 2). На сегодняшний день выявлено более 40 генов, ответственных за возникновение болезни Шарко-Мари-Тута [91].

Для болезни ШМТ первого типа (*демиелинизационная* невропатия, ШМТ1) характерно аутосомно-доминантное наследование, скорость проведения импульса в моторных нейронах верхних конечностей в среднем < 38 м/с, а повреждения затрагивают в основном миелиновую оболочку аксонов. На основе мутаций генов выделяют до 7 подтипов ШМТ1. Среди генов, мутации которых приводят к развитию ШМТ1, обнаружены гены белков миелиновой оболочки RMP22 и MPZ, ген белка легкой цепи нейрофиламентов (NEFL). Для второго типа ШМТ (*аксональная* форма невропатии, ШМТ2) описано 14 подтипов. Повреждения затрагивают сами аксоны, но скорость проведения остается в пределах нормы, т.е. > 38 м/с. Среди генов, мутации которых были обнаружены у пациентов с болезнью ШМТ2 значатся гены транспортного белка кинезина KIF5, митофузина 2 (MFN2, белок обеспечивающий транспорт митохондрий), катионного канала TRPV4, малой ГТФазы

RAB7A, малых белков теплового шока HspB1и HspB8. Невропатии, наследуемые по Х-сцепленному механизму (ШМТ Х или ШМТ5) не имеет четко выраженной зависимости скорости проведения импульса по нервному волокну, в связи с чем данную форму невропатии также называют «промежуточной». Для этого типа невропатии были обнаружены мутации в генах GJB1 (белок щелевого контакта коннексин 32) и PRPS1 (белок синтеза нуклеотидов рибозо-фосфат-пирофосфокиназа 1). «Промежуточную» форму невропатии с аутосомно-доминантным наследованием принято обозначать ПШМТ (4 подтипа). В ряде случаев наследование невропатии может быть аутосомно-рецессивным, поэтому, как правило, отдельно выделяют форму АР-ШМТ 1 или ШМТ 4 (аутосомно-рецессивная форма ШМТ 1, 13 подтипов) и АР-ШМТ 2 (аутосомно-рецессивная форма ШМТ 2, 4 подтипа) [91, 92].

Таблица 2. Классификация наследственных нейропатий человека по [90].

Клинический фенотип нейропатии	Тип наследования	Скорость проведения нервного импульса	Заболевание
МС	АД	< 38 м/с (в моторных нейронах верхних конечностей)	ШМТ 1
МС	АД	> 38 м/с (в моторных нейронах верхних конечностей)	ШМТ 2
МС	Сцепленное с Х-хромосомой	16-60 м/с	ШМТ1 Х
МС	АР	> 38 м/с	АР-ШМТ 2
МС	АР	< 38 м/с	ШМТ 4
МС	АД	16-60 м/с	ПШМТ
М	АД/АР	Чаще всего > 38 м/с	ДВМН

Примечание: МС – мотосенсорная нейропатия; М – моторная нейропатия; АД – аутосомно-доминантный тип наследования; АР – аутосомно-рецессивный тип наследования; ШМТ – заболевание Шарко-Мари-Тута; ДВМН – Дистальная Врожденная Моторная Нейропатия; ПШМТ – Промежуточная форма болезни Шарко-Мари-Тута.

5.3. Мутации в гене малого белка теплового шока HspB1 и невропатии периферической нервной системы

Аминокислотные замены HspB1, коррелирующие с развитием невропатий, располагаются как в вариабельных N- и С-концевых участках молекулы белка, так и в консервативном α -кристаллиновом домене (табл. 3, рис. 4). Наибольшее количество мутаций содержится в центральном α -кристаллиновом домене (рис. 4). Свойства некоторых мутантных белков HspB1 были изучены на разных уровнях: от физико-химических особенностей до получения трансгенных животных, экспрессирующих мутантные белки.

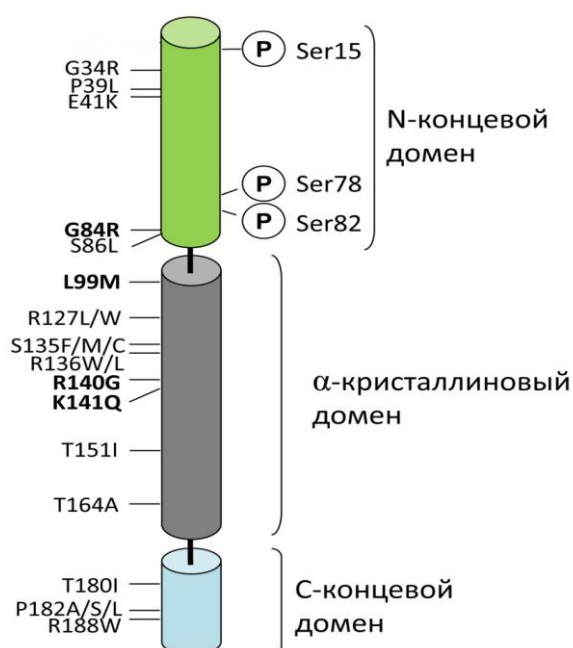


Рис. 4. Схема аминокислотных замен малого белка теплового шока HspB1, наличие которых коррелирует с развитием нейродегенеративных заболеваний. P – аминокислотные остатки Ser 15, 78 и 82, фосфорилируемые MAPKAP киназой 2. Полужирным шрифтом отмечены а.к. замены HspB1, исследованные в работе.

Рассмотрим свойства мутантных форм HspB1 с заменами G34R, P39L и E41K, которые располагаются рядом с полуконсервативным участком (WDPF-доменом), участвующим в формировании олигомеров sHsp [31, 93]. Олигомеры, образуемые данными мутантными формами, обладают повышенной стабильностью, и, в отличие от белка дикого типа, представлены крупными олигомерами даже при максимальной степени фосфорилирования MAPKAP киназой 2 [94]. Исследованная на модельных субстратах шапероноподобная активность мутантных белков ниже, чем у белка дикого типа. Помимо трех вышеописанных аминокислотных замен, в N-концевом домене была обнаружена

мутация с.349G>C, которая приводит к аминокислотной замене G84R [95]. Данное положение находится в последовательности, узнаваемой MAPKAP киназами 2/3, поблизости от фосфорилируемого остатка Ser82. Синтез мутантного белка с заменой G84R в клетках культуры HeLa сопровождался его повышенной агрегацией по сравнению с белком дикого типа [96].

В консервативном α -кристаллиновом домене HspB1 выявлены а.к. замены R127W, S135F/S135M, R136W, R140G, K141Q, которые расположены либо в составе петли, соединяющей β 5- и β 7-складки (R127W), либо в составе самой β 7-складки (все остальные) (рис. 1Б, рис. 3). Напомним, что структурной единицей малых белков теплового шока является димер, образующийся за счет взаимодействия β 7 складок соседних мономеров [25]. Ранее полученные экспериментальные данные свидетельствуют в пользу того, что аминокислотные замены R127W, S135F и R136W приводят к диссоциации крупных олигомеров и накоплению мономерных форм HspB1 [97]. Тот факт, что авторы обнаружили образование мономерных форм мутированных белков, вызывает определенное сомнение потому что ранее в клетках не отмечалось образования мономеров HspB1. Шапероноподобная активность указанных мутантных форм и их сродство к белкам-субстратам, в частности, к тубулину выше, чем у белка дикого типа [97]. Нам кажется, что эти в высшей степени интересные данные нуждаются в дополнительной проверке и подтверждении. Наличие вышеперечисленных замен в структуре HspB1 оказывает влияние на формирование цитоскелета клетки и затрагивает аксональный транспорт [98, 99].

Точечные а.к. замены R140G и K141Q также располагаются в β 7 складке α -кристаллинового домена. Наличие данных а.к. замен сопровождается появлением симптомов, характерных для болезни Шарко-Мари-Тута 2 типа [95]. На момент начала данного исследования в литературе отсутствовала информация по свойствам мутантного белка R140G, однако позднее появилась статья Эллиот и соавт., в которой было показано, что мутантный белок нестабилен и в определенных условиях диссоциирует до малых олигомеров [80].

В последней β -складке ACD (β 9) была обнаружена точечная замена T164A [100]. Олигомеры мутантного белка менее стабильны, при этом шапероноподобная активность не отличается от активности белка дикого типа [101]. В экзоне 3, кодирующем С-концевой участок HspB1, было обнаружено несколько точечных и 2 делеционных мутации (табл. 3). Особый интерес вызывает группа а.к. замен остатка Pro182, который входит в состав консервативного для многих представителей семейства sHsp мотива IXI. Указанный мотив играет важную роль в олигомеризации малых белков теплового шока. В настоящее время обнаружены три возможных варианта замен: P182A, P182L и P182S. Среди них замена P182L

сопровождается наиболее ранним появлением симптомов невропатии (в 5 лет), которые очень быстро развиваются и уже в 16 годах у пациента ярко выражены трудности с хождением, слабость в верхних и нижних конечностях, деформация стопы. Вероятно, именно поэтому мутантные формы HspB1 с заменами P182L и P182S наиболее подробно изучены. Описанные в литературе свойства мутантного белка можно объединить в несколько групп: структура белка, шапероноподобная активность, взаимодействие с белками партнерами. Шапероноподобная активность мутантного белка HspB1 P182L значительно снижена. Клетки первичной культуры коры головного мозга, синтезирующие мутантный HspB1 P182L теряют устойчивость к воздействию высоких температур. Помимо этого, мутантный белок нестабилен и образует агрегаты в теле нейрона [102]. Похожую тенденцию демонстрирует и мутантная форма белка с заменой P182S. Антиагрегационная активность мутантной формы, измеренная *in vitro*, значительно меньше активности белка дикого типа. Экспрессия данного белка в бактериях также приводила к накоплению HspB1 P182S в виде нерастворимых агрегатов [101]. Функциональные исследования показали, что в клетках, экспрессирующих мутантную форму HspB1 P182L, нарушен ретроградный транспорт, обеспечиваемый динеин-динактиновым комплексом [102] и повышен уровень фосфорилирования нейрофиламентов [103]. Важно отметить, что экспрессия HspB1 P182L в клетках не всегда сопровождается его агрегацией [103, 104]. По-видимому, данный эффект зависит от клеточной линии и уровня экспрессии белка. По последним данным белок HspB1 с заменой P182L взаимодействует с РНК-связывающим поли-(С)-связывающим белком (РСВР1), понижая его активность, что сопровождалось увеличением трансляции модельного белка – люциферазы [104].

Помимо описанных а.к. замен Pro182, в С-концевом домене выявлено ещё две точечные замены: T180I и R188W [105, 106]. Четвертичная структура и шапероноподобная активность HspB1 T180I не отличаются от белка дикого типа [101]. Мутантная форма с заменой R188W проявляет сниженную шапероноподобную активность *in vitro* [101].

Таблица 3. Классификация мутаций *HspB1* человека.

Мутации		Заболевание и тип наследования	Ссылка
Нуклеотидные замены/делеции	Аминокислотные замены		
N-концевой домен HspB1			
c.20C>G (экз. 1)	P7R	ШМТ2	[105]
c.45C>A (экз. 1)	S15R	ПН	[107]
c.100G>A (экз. 1)	G34R	ДВМН (НД)	[106]
c.116C>T (экз. 1)	P39L	ДВМН/ШМТ2 (АД)	[95, 106]
c.121G>A (экз. 1)	E41K	ДВМН (АД)	[106]
c.250G>C (экз. 1)	G84R	ДВМН/ШМТ2 (АД)	[95, 96]
c.257C>T (экз. 1)	S86L	ДВМН/БАС	[108]
α-кристаллиновый домен HspB1			
c.295C>A (экз. 1)	L99M	ДВМН/ШМТ2 (АР)	[95]
c.379C>T (экз. 2)	R127W	ДВМН (АД)	[109-111]
c.380G>T (экз. 2)	R127L		
c.404C>T (экз. 2)	S135F	ДВМН/ШМТ2 (АД)	[95, 109, 110, 112, 113]
c.404C>G (экз. 2)	S135C	ШМТ2	
c.404C>A (экз. 2)	S135Y	ШМТ2	
c.406C>T (экз. 2)	R136W	ШМТ2 (АД)	[106, 109]
c.407G>T (экз. 2)	R136L		
c.418C>G (экз. 2)	R140G	ДВМН/ШМТ2 (АД)	[95, 114]
c.421A>C (экз. 2)	K141Q	ДВМН (АД)	
c.452C>T (экз. 3)	T151I	ДВМН (АД)	[109]
c.490A>G (экз. 3)	T164A	ШМТ2 (АД)	[100]
c.476_477delCT (экз. 3)	Ser158 fsX200	ПН (АД)	[106, 115]
c.505delA (экз. 3)	Met169Cys fs2	ШМТ2 (АД)	[111]
С-концевой домен HspB1			
c.523C>T (экз. 3)	Gln175X	ШМТ2	[116]
c.539C>T (экз. 3)	T180I	ДВМН/ШМТ2 (АД)	[105]
c.544C>G (экз. 3)	P182A	ДВМН	[109, 113, 117]
c.545C>T (экз. 3)	P182L	ДВМН (АД)	
c.544C>T (экз. 3)	P182S	ДВМН (АД)	
c.562C>T (экз. 3)	R188W	ШМТ2 (АД)	[106]
Примечание: АД – аутосомно-доминантный тип наследования; АР – аутосомно-рецессивный тип наследования; БАС – боковой амиотрофический склероз; ДВМН – Дистальная Врожденная Моторная Невропатия; НД – нет данных; ПН – периферическая невропатия; ПШМТ – Промежуточная форма болезни Шарко-Мари-Тута; ШМТ – заболевание Шарко-Мари-Тута; экз. – экзон. Розовым цветом отмечены мутации HspB1 и а.к. замены в белке, исследованные в работе.			

К настоящему времени известно две делеционные мутации *HspB1*. В результате первой из них (476_477delCT) сдвигается рамка считывания, вследствие чего происходит преждевременная терминации трансляции из-за появления стоп-кодона [115]. Образовавшийся в результате такой мутации белок p.Ser158fsX200 состоит из 200 аминокислот, последней незатронутой изменениями аминокислотой при этом является Ser158, относящийся к консервативному α -кристаллиновому домену. Подобный сдвиг рамки считывания полностью нарушает структуру С-концевого домена. Другая делеционная мутация в 3 экзоне – c.505delA – приводит к синтезу укороченного белка Met169Cys fs2. Исследование клеточных линий, синтезирующих мутантную форму выявило, что данные клетки хуже переносят тепловой шок, что может быть связано со сниженной шапероноподобной активностью такого белка [111].

Наконец, при замене цитозина 523 на тимин (c.523 T>C) полипептидная цепь *HspB1* обрывается на Thr174, при этом такой белок теряет С-концевой участок [118]. Физико-химические свойства данного белка остаются неизученными, но можно предположить, что отсутствие С-концевого участка может сказываться на способности мутантной формы образовывать олигомеры.

5.4. Возможные механизмы развития невропатий

Как уже было сказано, заболевание Шарко-Мари-Тута первого типа связано с процессами демиелинизации, что приводит к снижению проводимости импульсов по нейрону. При заболевании ШМТ2 миелиновые оболочки, а, следовательно, и скорость проведения импульса остаются незатронутыми, однако ввиду собственно аксональных повреждений, снижается число нейронов, способных проводить импульс. Обращает на себя внимание тот факт, что белки, мутации в генах которых сопровождаются развитием болезни ШМТ 2 типа, отвечают за поддержание жизнедеятельности нервных клеток на разных уровнях: от аксонального транспорта (KIF1 β , MFN2, RAB7A) до системы белкового гомеостаза (белки, участвующие в процессах трансляции AARS и GARS, белки теплового шока *HspB1* и *HspB8*). Основываясь на клеточных исследованиях, одной из основных причин возникновения невропатии Шарко-Мари-Тута 2 типа в настоящее время считается нарушение аксонального транспорта в периферических нейронах [91, 119]. Нарушения аксонального транспорта могут быть связаны с мутациями в генах нескольких групп белков. В первую группу можно отнести различные повреждения моторных белков (к примеру, мутации в одной из изоформ кинезина, KIF1 β). А.к. замены в моторной части кинезина нарушают способность этого белка гидролизовать АТФ, что приводит к нарушению антероградного аксонального транспорта. Ретроградный транспорт в аксоне обеспечивает

другой моторный белок – динеин. Для связывания груза (карго) динеину необходим комплекс динактин, состоящий из нескольких белков, в том числе p150, для которого описаны мутации, приводящие к развитию БАС.

Во вторую группу можно отнести белки, а.к. замены в которых влияют непосредственно на структуру и свойства тех грузов, которые перемещаются по аксону. Одним из таких грузов (карго) являются митохондрии. Нарушение транспорта митохондрий в аксоне может приводить к изменениям энергетического обмена нейрона. Одним из белков, участвующих в прикреплении митохондрий к белкам-моторам, является митофузин-2 – белок, относящийся к семейству ГТФаз (dynamin-like GTPase) и расположенный на наружной мембране митохондрий [92].

Наконец, особую группу составляют белки, изменения которых приводят к повреждению цитоскелета аксона, преимущественно состоящего из микротрубочек и нейрофиламентов. Эта группа представляет для нас особый интерес, потому что она может быть тем или иным образом связана с функционированием малых белков теплового шока.

Согласно наиболее распространенной и цитируемой модели, предложенной Альмейда-Соуза и соавт., мутантные формы HspB1 (S135F, R136W) обладают повышенным сродством к тубулину и, связываясь с ним, способствуют стабилизации микротрубочек *in vivo*, эффективно защищая их от деполимеризации, вызываемой охлаждением или нокадазолом [98]. Трансгенные мыши, клетки которых синтезируют мутантные формы HspB1 S135F и R182L [120, 121], демонстрируют симптомы характерные для пациентов с болезнью Шарко-Мари-Тута 2 типа. Основываясь на экспериментальных данных Хольцбауэр и Шерер [122] предполагают, что именно чрезмерная стабилизация микротрубочек мутантными формами HspB1 приводит к дегенерации аксона. Возможно, стабилизация происходит по всей длине микротрубочек в аксоне, в то время как для пресинаптического участка необходимо динамичное состояние цитоскелета. Помимо этого увеличение связывания мутантных форм HspB1 может создавать стерические затруднения для связывания белков-моторов с микротрубочками, таким образом, блокируя аксональный транспорт. Кроме того, чрезмерная стабилизация микротрубочек может приводить к увеличению синтеза гистондеацетилазы 6 (HDAC6) [120, 121]. HDAC6 относится к классу цинк-зависимых гистондеацетилаз IIb, проявляя свою функциональную активность по отношению к α -тубулину, Hsp90 и кортактину [123]. HDAC6 обеспечивает удаление ацетильного остатка с Lys40 α -тубулина [124], что приводит к разборке микротрубочек. При этом процесс деполимеризации приобретает такие размеры, что он не может быть компенсирован даже избыточно прочным связыванием мутантных форм HspB1 с тубулином. Вследствие этого происходят существенные нарушения цитоскелета, которые могут

приводить к гибели нейрона. На сегодняшний день ингибиторы HDAC6 являются единственным терапевтическим средством при лечении болезни Шарко-Мари-Тута 2 типа [123].

Помимо микротрубочек различные авторы отмечают роль промежуточных филаментов в возникновении невропатии. У трансгенных мышей, клетки которых синтезировали мутантную форму HspB1 с заменой R136W, была выявлена моторная аксонопатия, вероятно, вызванная нарушением сети нейрофиламентов [125]. Кроме того, как ранее было сказано, для некоторых мутантных белков характерна повышенная тенденция к образованию агрегатов *in vivo* (замена P182L HspB1). При этом в составе агрегатов помимо самого HspB1 были обнаружены также белки нейрофиламентов, что приводило к изменениям морфологии клеток и нарушению аксонального транспорта [102]. Похожие изменения сети нейрофиламентов наблюдали и в клетках, экспрессирующих другую мутантную форму HspB1 S135F [109]. Тем не менее, в литературе отсутствовали данные о взаимодействии малых белков теплового шока с белками нейрофиламентов, оставляя открытым вопрос, возможно ли непосредственное влияние sHsp на сеть нейрофиламентов.

6. Промежуточные филаменты

Цитоскелет клеток состоит из трех основных компонентов: микрофиламентов («актиновые» филаменты), микротрубочек и промежуточных филаментов (ПФ). В отличие от высоко консервативных актина и тубулина, присутствующих во всех клетках, гомология последовательностей ПФ в некоторых случаях составляет менее 20%. При этом промежуточные филаменты человека обладают выраженной тканевой специфичностью [126]. У человека описано около 70 генов, кодирующих белки промежуточных филаментов [127]. По современным представлениям (на основе гомологии и способности образовывать гетеродимеры) выделяют 5 классов промежуточных филаментов: класс I («кислые» кератины), класс II («щелочные» кератины), класс III (десмин, виментин, периферин, GFAP), класс IV (нейрофиламенты, α -интернексин), класс V (ядерные ламины) [128].

6.1. Структура промежуточных филаментов

Для всех белков промежуточных филаментов характерны общие черты строения. В структуре ПФ выделяют несколько доменов: N-концевой домен, центральный α -спиральный домен («rod» домен) и C-концевой домен (рис. 5). Благодаря наличию центрального домена белки семейства ПФ образуют димерные структуры типа coiled-coil (суперспирали), которые затем собираются в фибриллы, средний диаметр которых составляет 10 нм, состоящие из 32

субъединиц в поперечном сечении [129, 130]. Процесс полимеризации ПФ от димеров до зрелых филаментов проходит, по-видимому, в три стадии (рис. 5) [131]. На первом этапе происходит очень быстрое образование тетрамеров ПФ. Димеры в составе тетрамеров могут быть ориентированы несколькими способами: A_{11} (антипараллельное расположение со сдвигом так, чтобы coiled-coil участки 1A и 1B одного димера находились напротив участков 1A и 1B другого димера), A_{22} (антипараллельное расположение со сдвигом так, чтобы coiled-coil участки 2A и 2B одного димера находились напротив участков 2A и 2B другого димера, рис. 5B), A_{12} (антипараллельное расположение без сдвига, N-концевые домены ПФ одного димера расположены напротив C-концевых доменов другого димера) и A_{CN} (характерно для ламин, параллельное расположение со значительным сдвигом при котором напротив друг друга располагаются конец coiled-coil участков 2B и C-концевые домены одного димера и N-

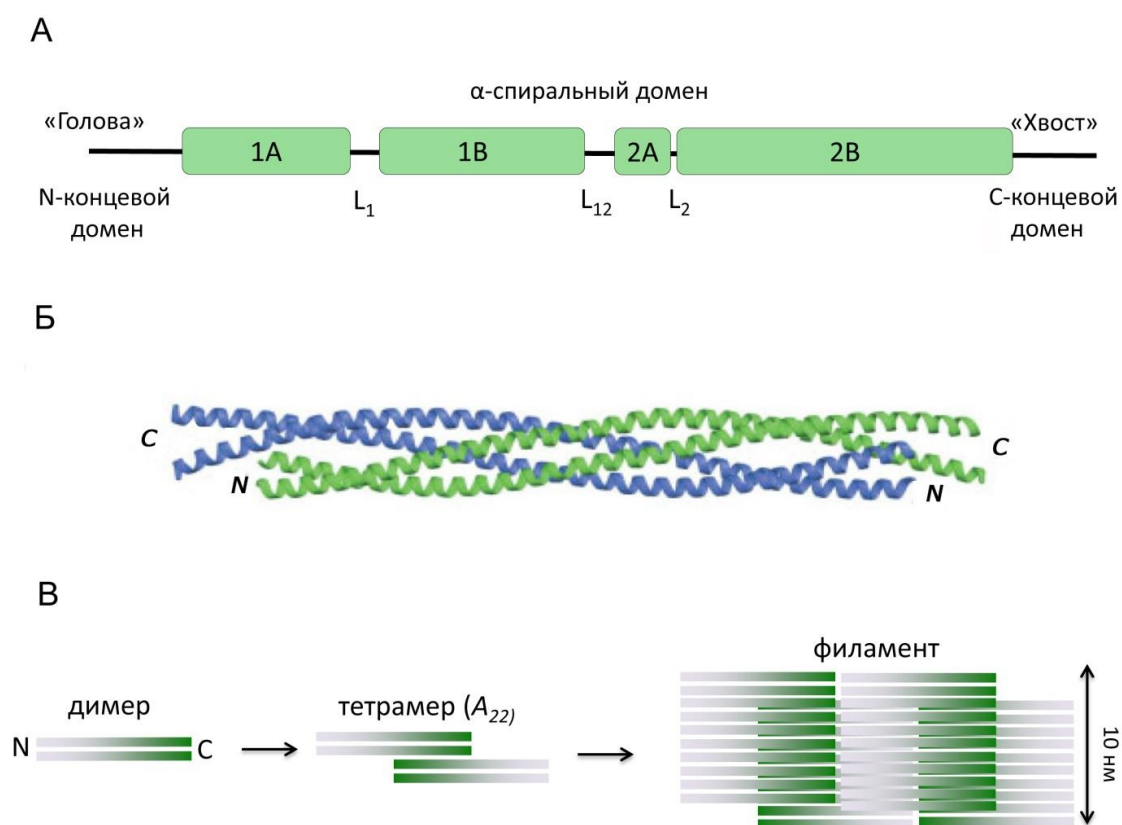


Рис. 5. А. Схема первичной структуры промежуточных филаментов. Зеленым цветом обозначены спиральные участки (1A, 1B, 2A и 2B). L – линкерные последовательности. **Б. Модель антипараллельного (A_{22}) взаимодействия 2B доменов двух димеров в составе тетрамера [129].** **В. Схема полимеризации промежуточных филаментов.** Серым и зеленым цветом обозначены N-конец и C-конец промежуточных филаментов, соответственно.

концевые домены и начало coiled-coil участков 1A другого димера)). На следующем этапе, взаимодействуя боковыми поверхностями, тетрамеры собираются в так называемые ULF-частицы (Unit Length Filaments), диаметр которых составляет около 16 нм. Наконец на последнем этапе происходит переупаковка субъединиц в составе ULF и удлинение филамента.

6.2. Нейрофиламенты

Как уж было сказано ранее ПФ, демонстрируют выраженную тканевую специфичность. Нервные клетки экспрессируют 5 белков промежуточных филаментов: периферин, α -интернексин и 3 белка нейрофиламентов (NFL (белок легкой цепи, 68 кДа), NFM (белок средней цепи, 102 кДа) и NFH (белок тяжелой цепи, 117 кДа) [132] (рис. 6). В зрелом аксоне стехиометрия изоформ белков нейрофиламентов NFL:NFM:NFH составляет 7:3:2, соответственно [133, 134]. Отличительной особенностью С-концевых доменов всех нейрофиламентов является наличие большого числа заряженных аминокислот, тем не менее, различные изоформы NF отличаются своими С-концевыми доменами. Так С-концевой домен белка легкой цепи нейрофиламентов (NFL) чрезвычайно короткий, по сравнению с NFM и NFH. Помимо этого С-концевые домены NFM и NFH содержат большое количество, так называемых, KSP мотивов, аминокислотных последовательностей, распознаваемых ERK1/2 MAPK, p38 MAPK, JNK, GSK3 и Cdk5 киназами [135]. Белок легкой цепи нейрофиламентов способен *in vitro* полимеризоваться и образовывать фибриллы, аналогичные другим представителям семейства промежуточных филаментов. Изучение полимеризации изолированных NFM и NFH *in vitro* показало, что процесс полимеризации этих двух изоформ нейрофиламентов останавливается на стадии тетрамеров. По-видимому, подобные отличия в поведении изоформ нейрофиламентов объясняются наличием длинных и заряженных С-концевых доменов NFM и NFH, создающих стерические и электростатические трудности для их полимеризации. Тем не менее, в присутствии белка легкой цепи происходит нормальная полимеризация всех изоформ NFL. Согласно современным представлениям, в зрелом филаменте именно NFL является основным структурным белком, образующим гетеродимеры с NFM и NFH. Имеющаяся стехиометрия изоформ, обеспечивает образование 1 гомодимера NFL, 3 гетеродимеров NFL/NFM и 2 гетеродимеров NFM/NFH. Нокаут по генам NFL и NFM приводит к существенному уменьшению диаметра аксонов (без изменения его длины) [136, 137].

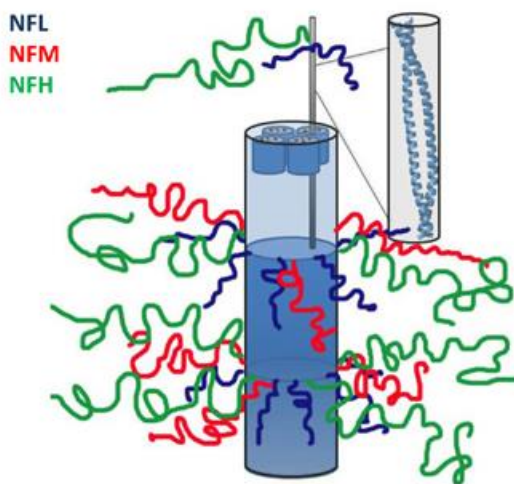


Рис. 6. Схема нативного нейрофиламента. NFL – белок легкой цепи, NFM – белок средней цепи, NFH – белок тяжелой цепи нейрофиламентов (по [166] с изменениями). Синим, красным и зеленым цветами показаны С-концевые домены NFL, NFM и NFH, соответственно.

Синтез белков и частичная полимеризация нейрофиламентов происходит в теле нейрона, после чего такие фрагменты транспортируются по системе микротрубочек моторными белками кинезином (антероградный транспорт) и динеином (ретроградный транспорт). Механизмы, регулирующие аксональный транспорт фрагментов промежуточных филаментов, на сегодняшний день остаются не до конца изученными. Тем не менее, известно, что фосфорилирование С-концевого домена NFH приводит к замедлению транспорта нейрофиламентов, вероятно, по причине открепления фосфорилированных филаментов от моторных белков [138]. Освободившиеся фрагменты NF встраиваются в сеть нейрофиламентов аксона. При этом важная роль отводится фосфорилированию С-концевых доменов NFH по KSP мотивам, которое обеспечивает взаимодействие отдельных фибрилл нейрофиламентов друг с другом [139]. Помимо этого фосфорилирование С-концевых доменов NFM и NFH (так называемых «ручек») играет важную роль в обеспечении взаимодействия между филаментами и стабилизации цитоскелета [140].

Фосфорилирование N-концевого домена нейрофиламентов цАМФ-зависимой протеинкиназой (ПКА) или ПКС также является важным механизмом регуляции динамики нейрофиламентов [141]. Фосфорилирование протеинкиназой A *in vitro* тормозит полимеризацию NFL и вызывает разборку уже имеющихся филаментов [141]. *In vitro* было идентифицировано около 11 участков NFL, фосфорилируемых протеинкиназами A и C, однако, только для небольшого числа этих участков была подтверждена возможность фосфорилирования *in vivo* [138, 142, 143]. Считается, что аминокислотные остатки Ser 2 и

Ser 55 фосфорилируются ПКА, Ser57 – ROK (Rho-зависимая протеинкиназа, Rho-семейство малых ГТФаз), Ser57 и Ser66 – CaMKII киназами. Йейтс и соавторы показали, что а.к. замены, имитирующие фосфорилирование N-концевого домена NFL, приводят к разрушению сети нейрофиламентов в клетках. В нейронах, экспрессирующих четверной точечный мутант, с заменами серинов 2, 55, 57 и 66 на аспарагиновую кислоту не происходило формирования сети нейрофиламентов. Помимо этого фосфоимитирующие мутантные белки существенно снижали транспорт нейрофиламентов [138].

Нарушения в нормальном распределении нейрофиламентов в нейронах считается причиной возникновения и развития многих заболеваний нервной системы (невропатий). Условно, можно выделить 2 группы невропатий, связанных с белками семейства NF: первичные (коррелируют с мутациями в гене *NEFL*, кодирующем белок легкой цепи нейрофиламентов) и вторичные (мутации в генах других белков, которые также приводят к нарушениям сети нейрофиламентов) [144]. В настоящее время известно более 14 мутаций в гене белка легкой цепи нейрофиламентов, наличие которых сопровождается развитием болезни Шарко-Мари-Тута 1 (подтип ШМТ 1F) и 2 типов (подтип ШМТ 2E) [145]. Помимо этого, агрегация белков нейрофиламентов является отличительной чертой еще целого ряда нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь ШМТ 2 типа, коррелирующая с мутациями *HspB1*, болезнь Альцгеймера, БАС и диабетическая невропатия.

* * *

За последние годы было описано более 20 мутаций *HspB1*, коррелирующих с развитием невропатий периферической нервной системы. Аминокислотные замены были обнаружены во всех доменах малого белка теплового шока *HspB1*. Закономерно возникает вопрос, как именно данные аминокислотные замены влияют на структуру, свойства и функциональную активность *HspB1*? Несмотря на довольно подробное изучение влияния замен некоторых аминокислот на функции *HspB1* (R127W, S135F, R136W [97], P182L [102]), ряд важных а.к. замен до начала настоящей работы не был исследован. В качестве объекта исследования нами были выбраны четыре мутантные формы *HspB1* с аминокислотными заменами в центральном α -кристаллиновом домене (L99M, R140G и K141Q) и на границе N-концевого и α -кристаллинового домена (G84R).

Материалы и методы

1. Получение компетентных клеток *E.coli* и их трансформация

Клетки *E.coli* штамма DH5 α , TOP10F' или BL21(DE3)pLysS (из суспензии бактерий в 10% глицерине или 7% ДМСО, хранящейся на -70 °C) переносили в 15 мл однократной среды LB и растили ночь при перемешивании (180 об/мин) при 37 °C. Все операции проводили в стерильных условиях. На следующий день 2 мл клеточной суспензии переносили в 200 мл жидкой среды LB и растили при 37 °C до достижения оптической плотности, равной 0,4-0,6 единиц при 600 нм. Далее охлаждали клеточную суспензию 30 мин на льду и центрифугировали 30 мин при 4 °C при 4500 g. Супернатант удаляли, осадок суспендировали в 10 мл холодного стерильного буфера TSS: однократная среда LB pH 6,5, содержащая 10% ПЭГ M_r 6000, 5% DMSO, 50 mM MgCl₂. Полученную суспензию бактерий оставляли на 10 мин на льду. Компетентные клетки *E.coli* расфасовывали по 100-200 мкл, быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -70 °C [146].

Для трансформации аликвоту компетентных клеток размораживали на льду в течение 20-30 мин, добавляли плазмиду (не менее 10 нг ДНК) и инкубировали на льду 30 мин. Суспензию клеток подвергали тепловому шоку (42 °C, 50 сек), быстро переносили в лед, добавляли 900 мкл однократной среды LB и инкубировали 1 час при 37 °C при перемешивании. По окончании инкубации 50-100 мкл суспензии клеток высевали на твердую среду LB-агар, содержащую селективный антибиотик (конечная концентрация ампициллина 100 мкг/мл, канамицина – 50 мкг/мл).

2. Получение плазмид, содержащих кодирующие последовательности исследуемых белков

Для получения точечных мутантных форм, содержащих замены R140G и K141Q, полноразмерную кДНК малого белка теплового шока HspB1 дикого типа амплифицировали двумя фрагментами с использованием следующих наборов праймеров. Для получения первого фрагмента: ген-специфичный прямой праймер (HspB1-WT fw) и мутагенный обратный праймер (HspB1-Mut rev), для второго – ген-специфичный обратный праймер (HspB1-WT rev) и мутагенный прямой праймер (HspB1-Mut fw) (табл.4). Синтез праймеров осуществляли в компании «Евроген».

ПЦР продукты подвергали препаративному ДНК-электрофорезу в 1% агарозном геле (бромистый этидий до кон. конц. 0,5 мкг/мл добавляли только в буфер для электрофореза TAE (трис-ацетатный буфер): 40 mM Трис pH 7,6, 1 mM ЭДТА). Выделяли фрагменты необходимой длины ~400 пн и ~200 пн из геля с использованием Silica Bead DNA Gel

Extraction Kit («Fermentas»). Для получения полноразмерных кодирующих последовательностей мутантных форм HspB1 фрагменты ~400 пн и ~200 пн, содержащие частично перекрывающиеся участки последовательности, смешивали и амплифицировали с использованием ген-специфичных праймеров HspB1-WT fw и HspB1-WT rev. ПЦР продукты пересаждали по следующей схеме. К пробам, полученным после прохождения ПЦР, добавляли 2,5 объема холодного 96% этилового спирта и NaCl до конечной концентрации 0,2 М, инкубировали 20 мин при -20 °С, центрифугировали 10 мин 9000 g. Тщательно удаляли супернатант, осадок дважды промывали холодным 70% спиртом. После последней промывки осадок хорошо высушивали, растворяли в воде, не содержащей эндонуклеаз, и подвергали электрофоруезу в 0,8% агарозном геле. На электрофореграммах выявляли полосу ~600 пн, которая являлась полноразмерной копией последовательности HspB1. Клонирование полученных последовательностей HspB1 в вектор pET23b проводили по сайтам рестрикции NdeI и XhoI. Для этого вектор и вставку одновременно обрабатывали двумя эндонуклеазами рестрикции NdeI и XhoI в буфере 4 («NEB»). Вектор после рестрикции подвергали обработке фосфатазой CIAP («Fermentas»). Рестрикционные фрагменты очищали через 1% агарозный гель и выделяли с использованием Silica Bead DNA Extraction Kit («Fermentas»), после чего осуществляли лигирование вектора и вставки Т4-ДНК лигазой («Fermentas»). Молярное соотношение вектор: вставка составляло 1:3. Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма DH5α или TOP10F' и высевали на твердую среду LB-агар. Скрининг бактериальных колоний на наличие плазмиды, содержащей вставку HspB1, проводили с использованием праймеров, комплементарных области Т7-промотора (T7-prom_long) и Т7-терминатора (T7-term_long) вектора pET23b. Клетки *E. coli*, по результатам скрининга содержащие в векторе ожидаемую вставку HspB1, наращивали в течение ночи при 37 °С при перемешивании 180 об/мин в 10 мл однократной среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Затем выделяли плазмиды методом щелочного лизиса по протоколу [147] или с помощью MiniPreps DNA Purification System (Promega). Наличие нуклеотидных замен в соответствующих положениях подтверждали секвенированием.

Вектора pET21a, содержащие кодирующие последовательности мутантных форм HspB1 с заменами G84R и L99M, были получены в компании «Евроген».

Вектор pET30a, содержащий кодирующую последовательность белка легкой цепи нейрофиламентов быка (далее – NFL) был любезно предоставлен к.б.н. Мининым А.А. (Институт Белка РАН).

Таблица 4. Последовательности праймеров.

Название праймера	Нуклеотидная последовательность
HspB1 - WT fw	5'-ttatcatatgaccgagcgccgctcccttc
HspB1 - WT rev	5'-attaactcgagtacttgccggcagtc
HspB1 - Mut R140G fw	5'-cgggtgcttcacgggaaaatacacgctgccc
HspB1 - Mut R140G rev	5'-cagcgtgtattttcccgtaagcaccg
HspB1 - Mut K141Q fw	5'-cccgggtgcttcacgcggcaatac
HspB1 - Mut K141Q rev	5'-tgtattgccgcgtgaagcaccgg
T7-prom_long	5'- tacgactcactataggagacc
T7-term_long	5'-atgctagtatttgctcagcgggtg

Примечание: Серым цветом выделены мутированные кодоны

3. Экспрессия белков

3.1. Экспрессия HspB1 дикого типа и его мутантных форм

Компетентные клетки E.coli штамма BL21(DE3)pLysS трансформировали плазмидами pET23b и pET21a, содержащими кодирующие последовательности HspB1 дикого типа и его мутантных форм. Нарращивание культур с одной колонии проводили в 50 мл среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина при 37 °C в течение ночи. 25 мл клеточной суспензии переносили в 500 мл LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и инкубировали при перемешивании при 37 °C до достижения оптической плотности, равной ~0,6 при 600 нм. Добавляли IPTG до конечной концентрации 0,5 mM и продолжали культивирование в течение 4 часов при 30 °C. Клеточную суспензию центрифугировали при 4000 g в течение 20 мин, супернатант удаляли, а осадок суспендировали в 30 мл лизис-буфера 1 (50 mM Трис-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 15 mM МЭ, 0,1 mM ФМСФ), замораживали и хранили при -20 °C.

3.2. Экспрессия белка легкой цепи нейрофиламентов

Компетентные клетки E.coli штамма BL21(DE3) pLysS трансформировали плазмидой pET30a, содержащей кодирующую последовательность NFL и высевали на твердую среду LB-агар, содержащую 50 мкг/мл канамицина. Нарращивание культур с одной колонии проводили в 50 мл жидкой среды LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина при 37 °C в течение ночи. Индукцию синтеза белка проводили либо добавлением IPTG (до конечной концентрации 0,5 mM), либо методом автоиндукции. При использовании метода

автоиндукции 25 мл клеточной суспензии переносили в 500 мл 3х-кратной среды LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина и инкубировали при перемешивании при 37 °С в течение дня, затем продолжали выращивание в течение ночи при перемешивании при 30 °С. Клеточную суспензию центрифугировали при 4000 g в течение 20 мин, супернатант удаляли, клеточный осадок суспендировали в 30 мл лизис-буфера 2 (50 mM MES pH 6,25, 190 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА, 15 mM МЭ, 0,2 mM ФМСФ), замораживали и хранили при -20 °С.

4. Выделение и очистка исследуемых белков

4.1. Выделение и очистка рекомбинантного HspB1 дикого типа и его мутантных форм

Схема выделения HspB1 представлена на рис. 7.

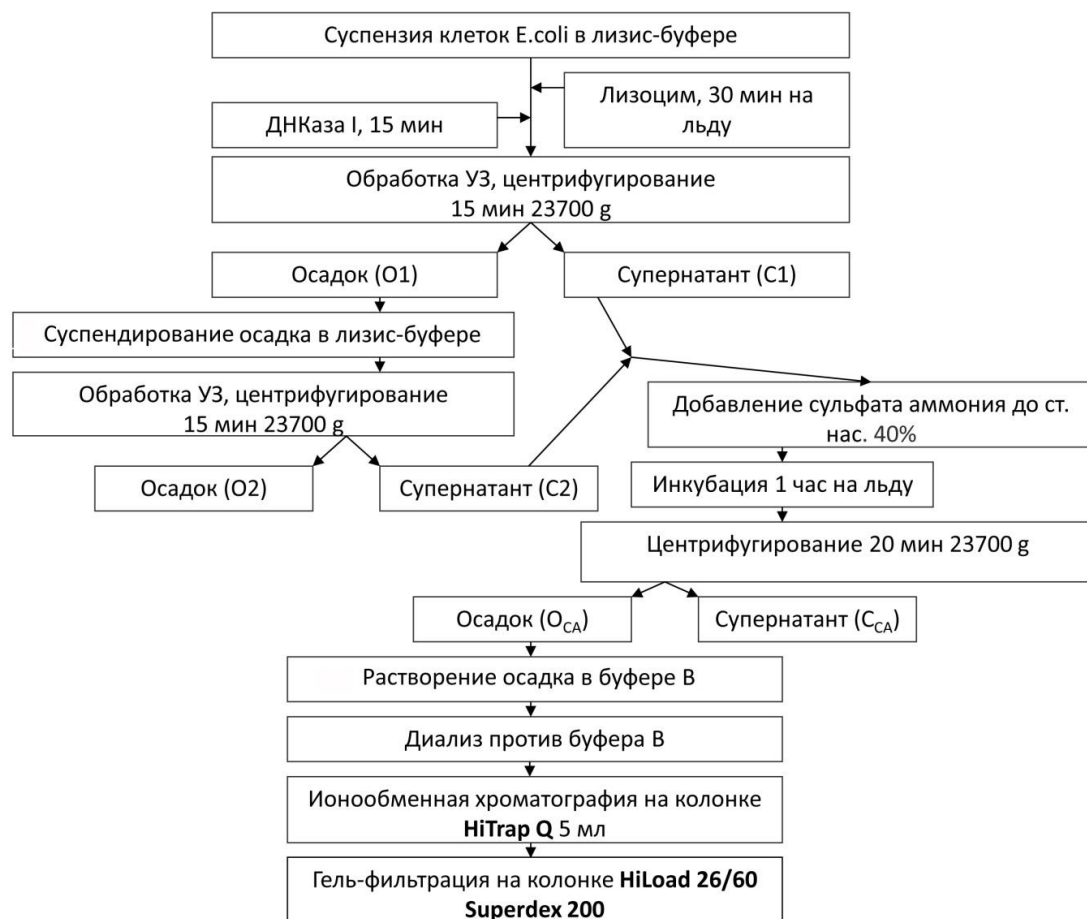


Рис. 7. Схема выделения и очистки малого белка теплового шока HspB1 дикого типа и его мутантных форм с точечными аминокислотными заменами. УЗ – обработка ультразвуком.

Суспензию клеток размораживали и инкубировали 30 мин на льду с лизоцимом (концентрация 0,06 мг/мл), затем добавляли ДНКазу I (конечная концентрация 3 мкг/мл) и $MgCl_2$ (до конечной концентрации 2 мМ) и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. После окончания инкубации суспензию подвергали ультразвуковой обработке на дезинтеграторе Branson S250D (выходная мощность 20%) 3 раза по 1 мин на льду. Полученную суспензию центрифугировали 15 мин при 23700 g. Супернатант (C1) собирали, осадок (O1) суспендировали в 25 мл лизис-буфера и повторяли операции, начиная с обработки ультразвуком. Супернатанты C1 и C2 объединяли, добавляли сульфат аммония до степени насыщения 40% и инкубировали 1 час при перемешивании на льду для формирования осадка. Полученную суспензию центрифугировали 20 мин при 23700 g. Супернатант удаляли (C_{CA}), а осадок (O_{CA}) растворяли в буфере В: 20 мМ Трис-ацетат pH 7,6, 10 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 15 мМ МЭ, 0,1 мМ ФМСФ и диализовали против 2 литров буфера В в течение ночи.

Диализат разводили буфером В до 60 мл и центрифугировали 30 мин при 105000 g. Супернатант собирали и порциями ~20 мл наносили на колонку HiTrapQ 5 ml (GE Healthcare), предварительно уравновешенную буфером В. Скорость нанесения и элюции 3 мл/мин. После нанесения колонку промывали 20 мл (4 объема колонки) буфера В. HspB1 элюировали линейным градиентом соли (10-360 мМ NaCl) общим объемом 60 мл (12 объемов колонки) и собирали фракции по 2 мл. Фракции, содержащие наибольшее количество HspB1 (по данным электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН), объединяли и концентрировали до 8-10 мл. Частично очищенный препарат после ионообменной хроматографии подвергали дополнительной очистке методом гель-фильтрации на колонке HiLoad 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare). Концентрированный препарат наносили на колонку, уравновешенную буфером В с pH 8,0, содержащим 150 мМ NaCl. Скорость нанесения и элюции составляла 2 мл/мин. Фракции объемом 3 мл, содержащие наиболее высокоочищенный HspB1, объединяли и концентрировали. Полученный препарат диализовали в течение ночи против 2 л буфера В, содержащего 1 мМ ДТТ (вместо МЭ), разделяли на аликвоты и хранили при -20 °С. Мутантные формы HspB1, содержащие точечные замены, выделяли, используя аналогичную методику.

4.2. Получение других малых белков теплового шока

Препараты малых белков теплового шока HspB5 (α В-кристаллин) и HspB6 дикого типа и «цистеиновый мутант» HspB6 были получены по ранее описанным методикам [17, 25, 148] и любезно предоставлены Е.С. Герасимович, Л.К. Мурановой и Е.В. Мырниковым.

Начальные стадии выделения малого белка теплового шока HspB8 проводили аналогично методу, использованному для выделения малого белка теплового шока HspB1. Высаливание белков сульфатом аммония проводили в диапазоне 0-30% насыщения сульфата аммония. Полученную суспензию центрифугировали 20 мин при 23700 g. Супернатант отбрасывали (C_{CA}), а осадок (O_{CA}) растворяли в буфере В и диализовали против 2 литров буфера В в течение ночи.

Диализат разводили до 60 мл и центрифугировали 30 мин при 105000 g. К супернатанту добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 0,3 М и наносили порциями по 30 мл на колонку HiTrap Phenyl-Sepharose 5 ml (Amersham Biosciences), предварительно уравновешенную буфером В, содержащим 0,3 М $(NH_4)_2SO_4$. Скорость нанесения и элюции 1,5 мл/мин. Колонку промывали 20 мл (4 объема колонки) буфера В, содержащего 0,3 М $(NH_4)_2SO_4$. HspB8 элюировали уменьшающимся градиентом сульфата аммония. На первой стадии проводили элюцию 50 мл буфера (10 объемов колонки), понижая концентрацию сульфата аммония от 0,3 до 0,015 М. На второй стадии элюцию проводили 35 мл буфера, линейно понижая концентрацию сульфата аммония с 0,015 М до 0. Фракции, содержащие наибольшее количество HspB8 (по данным электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН), объединяли и концентрировали до 8-10 мл. Частично очищенный препарат белка после гидрофобной хроматографии подвергали дополнительной очистке методом гель-фильтрации на колонке HiLoad 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare). Концентрированный препарат белка наносили на колонку HiLoad 26/60 Superdex 200, уравновешенную буфером В, содержащим 150 мМ NaCl. Скорость нанесения и элюции составляла 2 мл/мин. Фракции объемом по 3 мл, содержащие наиболее высокоочищенный HspB8, объединяли и концентрировали. Полученный препарат диализовали в течение ночи против 2 л буфера В, содержащего 1 мМ ДТТ, разделяли на аликвоты и хранили при -20 °С.

4.3. Выделение и очистка рекомбинантного белка легкой цепи нейрофиламентов

В работе использовали рекомбинантный белок легкой цепи нейрофиламентов быка (NFL). Первичные структуры белка легкой цепи нейрофиламентов быка и человека высококонсервативны и отличаются единичными аминокислотными заменами (рис. 8А). Схема выделения NFL представлена на рис. 8Б. Суспензию клеток размораживали и подвергали ультразвуковой обработке на дезинтеграторе Branson S250D (выходная мощность 20%) 4 раза по 1 мин на льду. Полученную суспензию центрифугировали 20 мин при 23700 g. Супернатант удаляли, выделение белка NFL проводили из фракции телец включения. Осадок телец включения тщательно суспендировали в лизис-буфере 2 (50 мМ

MES pH 6,25, 190 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА, 15 mM МЭ, 0,2 mM ФМСФ) и центрифугировали 20 мин при 23700 g. Тельца включения отмывали несколько раз, последовательно заменяя среду отмывания (2 раза лизис-буфер, 2 раза лизис-буфер, содержащий 1% Triton X-100, 2 раза лизис-буфер, содержащий 0,5% Triton X-100 и 1,5 M NaCl и 2 раза лизис-буфер). Осадок «отмытых» телец включения хранили при 4 °C или при -20 °C. Для дальнейшей очистки осадок телец 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 подвергали ультрацентрифугированию при 105000 g 30 мин. Супернатант собирали и наносили на колонку HiTrap Q 5 ml (GE Healthcare), предварительно уравновешенную буфером Q. После нанесения белка колонку промывали 20 мл (4 объема колонки) буфера Q. NFL элюировали линейным градиентом соли (0-700 mM NaCl) общим объемом 40 мл (8 объемов колонки) и собирали фракции по 2 мл. Фракции, содержащие наибольшее количество NFL (по данным электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН), объединяли и доводили pH до 4,2 муравьиной кислотой. Дальнейшую очистку проводили на колонке HiTrap SP 5 ml (GE Healthcare), предварительно уравновешенной буфером SP (10 mM Трис/муравьиная кислота pH 4,0, содержащий 8 M мочевины, 0,1 mM ФМСФ, 30 mM МЭ). После нанесения белка колонку промывали 20 мл (4 объема колонки) буфера SP. NFL элюировали линейным градиентом соли (0-350 mM NaCl) общим объемом 50 мл (10 объемов колонки) и собирали фракции по 2 мл. Фракции, содержащие наибольшее количество NFL (по данным электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН), объединяли, доводили pH до 8,0, используя 1 M раствор Трис, и концентрировали ультрафильтрацией (MILIPORE 30,000 MWCO). Определяли концентрацию белка методом Бредфорда [149], разделяли на аликвоты и хранили на -70 °C.

A

```

SP|P07196|NFL_HUMAN  MSSFSYEPYYSTSYKRRYVETPRVHISSVRSGYSTARSAYSSYSAPVSSSLSVRRSYSSS  60
SP|P02548|NFL_BOVIN  MSSFSYEPYYSTSYKRRYVETPRVHISSVRSGYSTARSAYSSYSAPVSSSLSVRRSYSSS  60

SP|P07196|NFL_HUMAN  SGSLMPLENLDLSQVAAISNDLKSIRTQEKAQLQDLNDRFASFIERVHELEQQNKVLEA  120
SP|P02548|NFL_BOVIN  SGSLMPSLSLDLSQVAAISNDLKSIRTQEKAQLQDLNDRFASFIERVHELEQQNKVLEA  120

SP|P07196|NFL_HUMAN  ELLVLRQKHSEPSRFRALYEQEIRDLRLAAEDATNEKQALQGEREGLEETLRNLQARYEE  180
SP|P02548|NFL_BOVIN  ELLVLRQKHSEPSRFRALYEQEIRDLRLAAEDATNEKQALQGEREGLEETLRNLQARYEE  180

SP|P07196|NFL_HUMAN  EVLSREDAEGRMEARKGADEAALARAEELEKRIDSLMDEISFLKKVHEEEIAELQAQIQY  240
SP|P02548|NFL_BOVIN  EVLSREDAEGRMEARKGADEAALARAEELEKRIDSLMDEIAFLKKVHEEEIAELQAQIQY  240

SP|P07196|NFL_HUMAN  AQISVEMDVT-KPDLSSAALKDIRAQYEKLAAKNMQNAEEWFKSRFTVLTESAAKNTDAVR  299
SP|P02548|NFL_BOVIN  AQISVEMDVSSKPDLSSAALKDIRAQYEKLAAKNMQNAEEWFKSRFTVLTESAAKNTDAVR  300

SP|P07196|NFL_HUMAN  AAKDEVSESRLLKAKTLEIEACRGMNEALEKQIQELEDKQNADISAMQDTINKLENELR  359
SP|P02548|NFL_BOVIN  AAKDEVSESRLLKAKTLEIEACRGMNEALEKQIQELEDKQNADISAMQDTINKLENELR  360

SP|P07196|NFL_HUMAN  TTKSEMARYLKEYQDLLNVKMALDIEIAAYRKLEGEETRLSFTSVGSITSGYSQSSQVF  419
SP|P02548|NFL_BOVIN  TTKSEMARYLKEYQDLLNVKMALDIEIAAYRKLEGEETRLSFTSVGSLTTGYTQSSQVF  420

SP|P07196|NFL_HUMAN  GRSAYGGLQTSSYLMSTRSFPSYYTSHVQEEQIEVEETIEAAKAAEEAKDEPPSEGEAEEEE  479
SP|P02548|NFL_BOVIN  GRSAYGGLQTSSYLMSARSFPSYYTSHVQEEQIEVEETIEAAKAAEEAKDEPPSEGEAEEEE  480

SP|P07196|NFL_HUMAN  EKDKEEAEEEEAA-----EEEEAAKEESEEAKEEEEGGEGEGEETKEAEEEE  527
SP|P02548|NFL_BOVIN  EKEKEEAEEAEAEAEAEAEEEEGAQEEAAKEDA-EEAKEEEGGEGEEAEETKEAEEEE  539

SP|P07196|NFL_HUMAN  KKVEGAGEEQAAKKKD  543
SP|P02548|NFL_BOVIN  KKEDEGAGEEQATKKKKD  555
  
```

Б

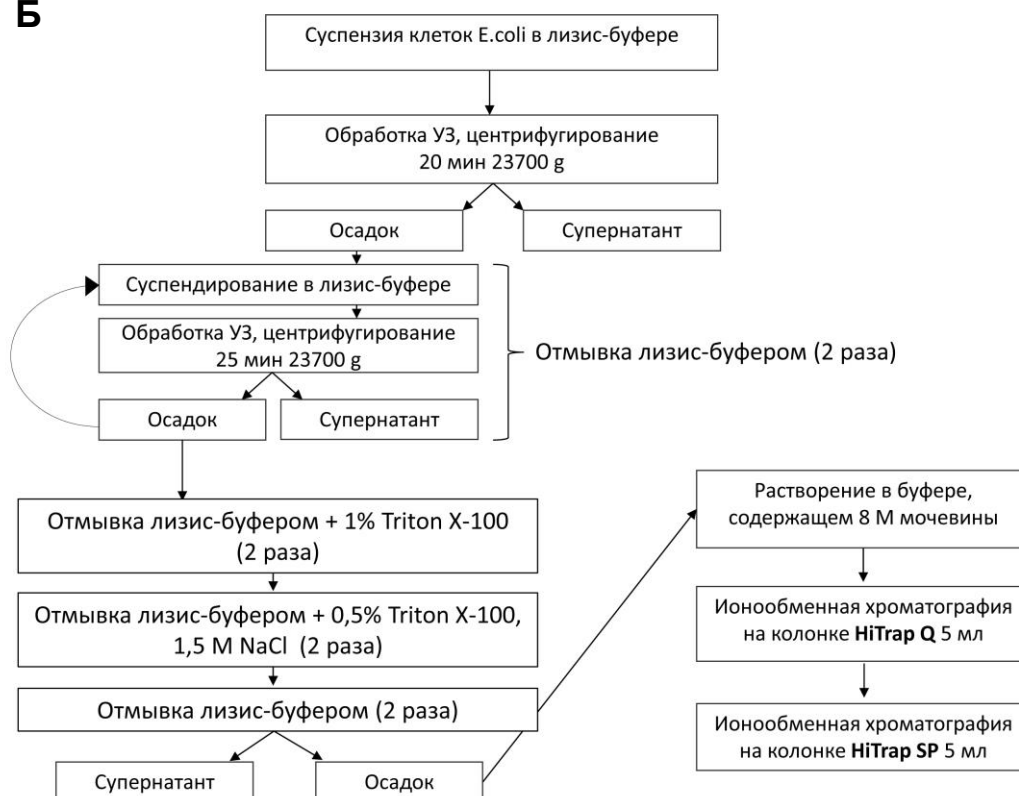


Рис. 8. А. Выравнивание первичных структур белка легкой цепи нейрофиламентов (NFL) быка и человека. Серым цветом показаны отличия в последовательности белка легкой цепи нейрофиламентов быка по отношению к белку NFL человека. **Б. Схема выделения и очистки белка легкой цепи нейрофиламентов NFL.** УЗ – обработка ультразвуком.

5. Методы исследования структуры и свойств белков

5.1. Ограниченный протеолиз

Трипсинолиз проводили в буфере В (20 мМ Трис-ацетат pH 7,6, 10 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 15 мМ МЭ), не содержащем ФМСФ при различных температурах. Весовое соотношение субстрат/фермент колебалось от 3000/1 до 8000/1. В работе использовали трипсин фирмы Sigma, обработанный тозил-L-фенилаланин-хлорметилкетон (ТРСК-трипсин). Обработка ТРСК позволяет необратимо ингибировать следовые количества химотрипсина, которые могут присутствовать в препаратах трипсина. Для предотвращения автопротеолиза раствор фермента готовили и хранили в 1 мМ HCl. Реакцию начинали добавлением трипсина и останавливали через 0, 3, 6, 10, 15, 20, 30, 60, 90 и 120 мин добавлением раствора ФМСФ (100 мМ раствор, приготовленный на изопропанол) до конечной концентрации 6 мМ. Полученные пробы анализировали методом электрофореза в присутствии ДСН. После окрашивания гели сканировали и при помощи программы ImageJ определяли интегральную интенсивность полос интактного белка и его протеолитических фрагментов. Для локализации участков протеолиза часть полученных пептидов анализировали методом масс-спектрометрии. Для этого после проведения электрофореза полосы, соответствующие протеолитическим фрагментам, вырезали из ПААГ и подвергали тандемной масс-спектрометрии на Ultraflex Extreme BRUKER масс-спектрометре. Автор выражает глубокую благодарность к.х.н. М.В. Серебряковой (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского) за проведение экспериментов по масс-спектрометрии.

5.2. Спектральные методы исследования

5.2.1. Флуоресцентные методы исследования

5.2.1.1. Триптофановая флуоресценция

Измерение собственной триптофановой флуоресценции позволяет охарактеризовать окружение остатков триптофана в структуре белка. Спектры собственной триптофановой флуоресценции HspB1 дикого типа и его мутантов (0,1 мг/мл) измеряли в буфере FF (20 мМ HEPES/NaOH pH 7,5, 100 мМ NaCl, 2 мМ ДТТ) в диапазоне длин волн от 300 до 400 нм при возбуждении светом с длиной волны 295 нм. Измерения проводили на спектрофлуориметре CaryEclipse (Varian) при 25 °C, ширине щелей обоих монохроматоров 5 нм и напряжении на ФЭУ 600-700 В.

5.2.1.2. Использование флуоресцентной спектроскопии для исследования термической денатурации

Изучение термостабильности белков является одним из подходов к изучению их структуры. Пробы, содержащие 0,05-0,1 мг/мл белка в буфере FF (20 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 100 mM NaCl, 2 mM ДТТ), нагревали со скоростью 1 °С/мин от 20 до 80 °С и затем охлаждали с такой же скоростью до 20 °С. Все эксперименты проводили на спектрофлуориметре CaryEclipse (Varian), оснащенном элементом Пельтье. За изменениями, происходящими в структуре белка в ходе тепловой денатурации, следили, регистрируя собственную триптофановую флуоресценцию, возбуждаемую светом с длиной волны 295 нм и регистрируемую при 320 и 360 нм. Кривые зависимостей интенсивности флуоресценции (I_{320}) от температуры (T) анализировали по методу, предложенному Бушуевой и соавт. [150]. Для этого строили зависимость обратной интенсивности флуоресценции ($1/I_{320}$) от T/η , где T – абсолютная температура, а η – вязкость растворителя в сантипуазах. Абсолютные величины вязкости при разных температурах в интервале $20 < t < 100$ °С вычисляли по эмпирической формуле [151]:

$$\eta = 1,002 * 10^{\left(\frac{1,3272 * (20 - T) - 0,001053 * (T - 20)^2}{T + 105}\right)}$$

где вязкость η выражена в сПз, а температура T – в °С.

Линейные участки на графике зависимости $1/I_{320}$ от T/η экстраполировали в область теплового перехода. По полученным уравнениям вида $1/I_{320} = a + b * (T/\eta)$ определяли значения интенсивностей флуоресценции I_{320}^{native} для нативного состояния и $I_{320}^{\text{denatured}}$ для денатурированного состояния белка. После этого рассчитывали величину завершенности теплового перехода α , выраженную в долях единицы, по формуле:

$$\alpha = (I_{320} - I_{320}^{\text{native}}) / (I_{320}^{\text{denatured}} - I_{320}^{\text{native}})$$

и строили график зависимости завершенности перехода α от температуры T , °С.

5.2.1.3. Использование флуоресцентного зонда bis-ANS для изучения структуры белка

Гидрофобный зонд ANS и его производные (к примеру, bis-ANS) широко используются для исследования гидрофобности белков. При попадании зонда в гидрофобное окружение резко увеличивается квантовый выход его флуоресценции при 495 нм. Как правило, у белков есть некоторое количество центров, обладающих высоким сродством к bis-ANS, и некоторое количество центров с низким сродством к зонду. Если связанные молекулы bis-ANS располагаются поблизости от аминокислотных остатков триптофана, то при возбуждении остатков триптофана светом длины волны 295 нм может происходить перенос энергии (FRET) на bis-ANS.

Изучение взаимодействия HspB1 дикого типа и его мутантов с гидрофобным зондом bis-ANS проводили в буфере F (50 мМ фосфат калия pH 7,5, 150 мМ NaCl, 15 мМ МЭ). Концентрация белка в пробе составляла 0,05 мг/мл. К пробе объемом 600 мкл добавляли порциями по 2-4 мкл 170-220 мМ раствор bis-ANS, приготовленный на буфере F, до конечной концентрации, равной 10 мМ. После добавления каждой аликвоты регистрировали флуоресценцию при следующих значениях длин волн возбуждающего (λ_{ex}) и испускаемого (λ_{em}) света: 1) $\lambda_{ex}=295$ нм, $\lambda_{em}=340$ нм, 2) $\lambda_{ex}=295$ нм, $\lambda_{em}=495$ нм и 3) $\lambda_{ex}=385$ нм, $\lambda_{em}=495$ нм. Такого рода измерения позволяют регистрировать изменение собственной триптофаной флуоресценции белка (1), флуоресценцию bis-ANS возбуждаемую в ультрафиолетовой области спектра вместе с флуоресценцией, обусловленной миграцией энергии от возбужденных остатков триптофана на близко расположенные молекулы bis-ANS (2) и, наконец, флуоресценцию связанного с белком bis-ANS, возбуждаемого в максимуме поглощения (3). Измерение флуоресценции производили на спектрофлуориметре CaryEclipse (Varian) при 25 °C, ширине щелей обоих монохроматоров 5 нм и напряжении на ФЭУ 600-700 В.

5.2.2. Метод динамического светорассеяния

Динамическое светорассеяние измеряли в образцах с концентрацией белка 0,3 мг/мл в буфере D (20 мМ Трис/ацетате pH 7.6, 150 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 0,1 ФМСФ, 15 мМ МЕ) при 25 °C на приборе Zetasizer Nano (Malvern). Каждое измерение проводили в течение 15 сек и повторяли 10 раз. Для каждого образца проводили не менее 10 таких циклов измерений. После проведения экспериментов в программе DTS (Nano) определяли размер частиц, анализируя зависимость измеряемого параметра от их способности рассеивать свет.

5.3. Методы изучения четвертичной структуры и белок-белковых взаимодействий

5.3.1. Метод аналитического ультрацентрифугирования

Перед проведением седиментационных исследований образцы HspB1 дикого типа и его мутантных форм диализовали против буфера С (50 мМ фосфатный буфер pH 7,5, содержащий 150 мМ NaCl, 2 мМ ДТТ) в течение ночи. После диализа проводили центрифугирование в течение 15 мин при 14000 g, осадок отбрасывали и определяли концентрацию белка в супернатанте спектрофотометрически. Разводили все образцы до одинаковой концентрации (концентрацию белка определяли на спектрофотометре Ultrospec 3100 Pro (Amersham Biosciences)). Опыты по скоростному ультрацентрифугированию проводили при 20 °C при 44000 об/мин на ультрацентрифуге Spinco модель E, используя

ротор AnJ-Ti с шестью двухсекторными ячейками. За процессом седиментации следили спектрофотометрически, регистрируя оптическую плотность при 280 нм по длине ячейки каждые 1,5 мин. Измерения начинали после достижения скорости вращения ротора в 44000 об/мин. Коэффициенты седиментации рассчитывали при помощи программы SEDFIT [152]. При проведении расчетов определяли распределение $s(s)$ от s , принимая фрикционное отношение равным 1,2, специфический объем белка равным 0,73, а плотность и вязкость буфера равными 1,0 и 0,01002. Автор глубоко благодарен сотруднику НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского П.В. Калмыкову за проведение опытов по ультрацентрифугированию.

5.3.2. Использование метода гель-фильтрации и химического сшивания для изучения четвертичной структуры малых белков теплового шока и их способности образовывать гетероолигомеры

Олигомерное состояние HspB1 дикого типа и его мутантов исследовали методом гель-фильтрации на колонке Superdex 200 HR 10/30 на хроматографе АСТА FPLC (GE Healthcare). Хроматографию проводили в 20 mM Трис-ацетатном буфере pH 7,6, содержащем 150 mM NaCl, 0,1 mM ЭДТА, 15 mM МЭ и 0,1 mM ФМСФ. Образцы, содержащие от 10 до 120 мкг белка, наносили на колонку в объеме 150 мкл. Скорость элюции белков составила 0,5 мл/мин. Колонку калибровали белками-стандартами: овальбумин (43 кДа), БСА (68 кДа), глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа из мышц кролика (144 кДа), ферритин (440 кДа), тироглобулин (669 кДа).

Перед изучением образования смешанных гомоолигомерных комплексов HspB1 дикого типа и его R140G мутантной формы каждый из белков подвергали предварительному восстановлению. Для этого препараты индивидуальных белков разводили буфером В до концентрации 1 мг/мл, добавляли ДТТ до конечной концентрации 15 mM и инкубировали при 37 °C в течение 30 мин. Восстановленные таким образом белки смешивали так, чтобы конечная концентрация каждого из белков в смеси составляла 0,5 мг/мл и инкубировали при 4 °C или при 42 °C в течение часа. Полученные пробы анализировали методами гель-фильтрации на колонке Superdex 200 HR 10/30 и электрофореза в ПААГ в присутствии мочевины по методу Перрье-Перри [153] (см. гл. 8.4).

Изучение взаимодействия малого белка теплового шока HspB1 и его точечных мутантных форм с HspB6 проводили двумя способами: методом гель-фильтрации на колонке Superdex 200 HR 10/30 и методом химического «сшивания» по остаткам цистеина. Для этого использовали, так называемый, «цистеиновый мутант» HspB6 [25]. В этом белке единственный эндогенный остаток цистеина C46 был заменен на серин, а остаток E116, расположенный в положении гомологичном цистеину C137 HspB1, был заменен на цистеин.

Таким образом, «цистеиновая» мутантная форма HspB6 имеет двойную замену C46S/E116C. Далее эта мутантная форма HspB6 будет обозначаться как HspB6Cys.

Перед экспериментом препараты индивидуальных белков разводили буфером В до конечной концентрации 1 мг/мл и инкубировали в присутствии 15 мМ ДТТ в течение 30 мин при 37° С для восстановления SH групп. HspB1 дикого типа или его мутантные формы смешивали с HspB6Cys так, чтобы конечная концентрация каждого из белков составляла 0,5 мг/мл. Полученную смесь инкубировали 1 час при 42 °С и проводили мягкое окисление путем диализа полученных образцов в течение ночи при 4 °С против буфера А (50 мМ трис-HCl pH 7,4, 50 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 0,1 мМ ФМСФ), не содержащего восстановителей. Анализ белкового состава проводили методом электрофореза ПААГ по методу Леммли [154]. Для приготовления образцов использовали 4-кратный буфер для образцов, не содержащий МЭ, и полученные пробы не подвергали предварительному нагреванию (см. главу 8.3).

Для фосфорилирования HspB1 использовали МАРКАР киназу 2, активацию которой проводили по следующей схеме. На первой стадии киназу р38 фосфорилировали конститутивно-активной киназой МКК6, инкубируя смесь протеинкиназ в течение 1 часа при 37 °С в буфере Р (25 мМ HEPES pH 7,5, 25 мМ β-глицерофосфат натрия, 2 мМ ДТТ, 20 мМ MgCl₂), содержащем 400 μМ АТФ. Затем в смесь добавляли МАРКАРК2 и продолжали инкубацию еще 1 час при 37 °С. Для фосфорилирования HspB1 дикого типа и его точечных мутантных форм G84R и L99M смесь киназ добавляли равными порциями в пробы, содержащие 0,7 мг/мл HspB1 (30 μМ) и 350 μМ АТФ. Пробы инкубировали при 37 °С, фосфорилирование останавливали через 0, 0,5, 1, 2, 5 и 20 часов добавлением ЭДТА до конечной концентрации 5 мМ или равного объема буфера для электрофореза по методу Перрье-Перри, содержащего 8 М мочевины (см. гл. 8.4) или замораживанием. За фосфорилированием HspB1 следили по изменению подвижности белков в ПААГ после проведения электрофореза по методу Перрье-Перри [153] (см. гл. 8.4). После окрашивания гели сканировали и при помощи программы ImageJ определяли интегральную интенсивность полос нефосфорилированного белка и его фосфорилированных форм.

5.4. Исследование олигомерного состояния HspB1 дикого типа и его точечной мутантной формы с заменой R140G в клетках линии HEK293F

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. Культивирование Expi293F проводили в среде Expi293Expression medium в колбах Эрленмейера в атмосфере 8% CO₂ при 37 °С, колбы закрепляли на орбитальном шейкере,

скорость перемешивания составляла 125 об/мин. Получение лентивирусов проводили по следующей схеме. Клетки Expi293F (Thermo Fisher Scientific) рассевали в объеме 15 мл среды Expi293Expression medium до плотности 2,9 млн клеток/мл, затем трансфецировали 15 мкг смеси плазмид (pLP1, pLP2, pLP/VSVG, pLenti6MV5_HspB1/GFP, (Thermo Fisher Scientific)). Весовое соотношение плазмид для ко-трансфекции pLP1/pLP2/ pLP_VSVG/ pLenti6MV5_HspB1/GFP составляло 2 /1/0,2/3. Трансфекцию проводили с использованием агента ExpiFectamine 293 Reagent по протоколу производителя. На 4-ый день после трансфекции клетки переносили в 50 мл пробирки и центрифугировали при 800 g 5 мин. Кондиционированную среду, содержащую лентивирусные частицы, аликвотили по 1 мл и хранили в криопробирках при -70 °C.

Для культивирования клеток линии HEK293F использовали среду следующего состава: DMEM High Glucose (Biological Industries), содержащую 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Biological Industries) и 10 мкг/л гентамицина. Перед использованием сыворотку инактивировали нагреванием при 56 °C в течение 30 мин. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при постоянной температуре 37 °C и 5% CO₂. При достижении 80-90 % конфлюэнтного монослоя клетки рассаживали в разведении 1/6-1/10. Для получения пулов клеток HEK293F, стабильно экспрессирующих HspB1 дикого типа и его мутантную форму R140G, клетки линии HEK293F рассевали в 12-луночные планшеты в количестве 75 тыс. клеток в 1,2 мл среды в лунку. Через 24 часа в лунки добавляли 20 мкл кондиционированной среды Expi293F, содержащей лентивирусные частицы, и гексадиметрина бромид (Polybrene) до конечной концентрации 5 мкг/мл. Заражение проводили методом спинокуляции, центрифугируя планшеты с HEK293F при 800 g, 30 °C в течение часа. По окончании спинокуляции клетки помещали в CO₂-инкубатор и через 4 часа заменяли среду на новую. На следующий день после трансдукции клетки снимали, подсчитывали в камере Горяева и пересаживали из лунок 12-луночного планшета в лунки 6 луночного планшета в количестве 10-15% от конфлюэнтного монослоя, т.е. 180 тыс. клеток на лунку. За эффективностью заражения следили по флуоресценции GFP в контроле. Через 24 часа начинали селекцию, добавляя бластицидин S до конечной концентрации 17 мкг/мл. Рабочую концентрацию антибиотика подбирали в предварительном эксперименте. Селекцию продолжали в течение 10-12 дней, заменяя среду с антибиотиком на новую каждые 2-3 дня. По окончании селекции клетки пересаживали из лунок в матрасы T75, масштабировали и замораживали. Экспрессию HspB1 дикого типа и мутантной формы R140G детектировали методом Western Blotting с использованием первичных антител к HspB1 (25-15) и тубулину (DM1A) и вторичных антимышиных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (см. 8.6). Лизис клеток проводили в буфере RIPA: 25 mM трис-HCl pH 7,6, содержащем 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-

40, 1% дезоксихолат Na, 0,1% ДСН, ингибиторы протеаз (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich).

Для изучения олигомерного состояния белков в лизате клетки наращивали в культуральных флаконах площадью 175 см² (T175). Клетки рассаживали в количестве 2,5 млн, через 2 дня отбирали среду, 2 раза промывали раствором фосфатно-солевого буфера/PBS (Панэко), 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)), снимали скребком для клеток и переносили в пробирки на 1,5 мл. Полученную суспензию клеток подвергали ультразвуковой обработке на дезинтеграторе Branson S250D (выходная мощность 10%) 3 раза по 15 сек на льду и центрифугировали при 105000 g, 4 °C в течение 1 часа. В супернатанте после центрифугирования измеряли концентрацию белка методом Бредфорда [149] (см. 8.2). Полученные лизаты анализировали методом гель-фильтрации на колонке Superdex 200 HR 10/30 на хроматографе АСТА FPLC (GE Healthcare). Хроматографию проводили в 20 mM Трис-ацетатном буфере pH 7,6, содержащем 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 0,1 mM ЭДТА, 15 mM МЭ и 0,1 mM ФМСФ. На колонку наносили 600-800 мкг тотального белка лизата в 200 мкл буфера для хроматографии. Для анализа содержания HspB1 собирали фракции объемом 400 мкл, к которым добавляли ТХУ до конечной концентрации 10%. Пробы инкубировали на льду в течение 1,5 часов, затем центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин при 4 °C. Осадки 2 раза промывали холодным раствором ацетона, высушивали и растворяли в буфере для образцов для электрофореза по методу Леммли (см. гл. 8.3). Детекцию HspB1 осуществляли методом Western Blotting с использованием первичных антител к HspB1 и вторичных антимышиных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Автор выражает глубочайшую благодарность к.б.н. Ф.Н. Розову (компания «Биалекса») за всестороннюю помощь в планировании и проведении экспериментов с культурами клеток.

5.5. Исследование взаимодействия малых белков теплового шока с белком легкой цепи нейрофиламентов

5.5.1. Использование метода скоростного центрифугирования для анализа взаимодействия малых белков теплового шока с NFL

Для анализа взаимодействия малых белков теплового шока с белком NFL использовали несколько экспериментальных подходов (рис. 9). В первом случае NFL в буфере, содержащем 8M мочевины, смешивали с малыми белками теплового шока. Полученную смесь диализовали против буфера полимеризации (буфера М) (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) в течение ночи при 37 °C (рис. 9А).

Во втором случае сначала проводили диализ NFL против буфера Т (5 мМ Трис/ацетат pH 8,0, содержащий 1 мМ ЭГТА) в течение ночи при 4 °С (рис. 9Б). В этом случае в диализате образовывались тетрамеры NFL. Полученные тетрамеры смешивали с малыми белками теплового шока и индуцировали процесс полимеризации добавлением 1/10 объема 200 мМ HEPES/NaOH pH 7,0, 1,9 М NaCl, 10 мМ MgCl₂.

Наконец, в третьем случае (рис. 9В) сначала проводили диализ NFL против буфера полимеризации (буфера М) (20 мМ HEPES/NaOH (pH 7,2), 0,19 М NaCl, 0,1 мМ ЭГТА, 1 мМ MgCl₂, 0,1 мМ ФМСФ, и 0,1 мМ МЭ) в течение ночи при 37 °С. К полученным таким образом филаментам (обычно концентрация мономеров NFL составляла 11 μМ) добавляли различные количества HspB1 (концентрация HspB1 варьировала в интервале от 2 до 12 μМ), инкубировали час при 37 °С и подвергали центрифугированию.

По окончании полимеризации образцы объемом 50-100 мкл подвергали низко-(10000 g, 30 мин, 37 °С) и высокоскоростному (105000 g, 60 мин, комнатная температура) центрифугированию. Белковый состав супернатантов и осадков после центрифугирования анализировали методом электрофореза в присутствии ДСН (см. 8.3). Гели окрашивали и сканировали, интегральную интенсивность полос измеряли в программе GelAnalyzer.

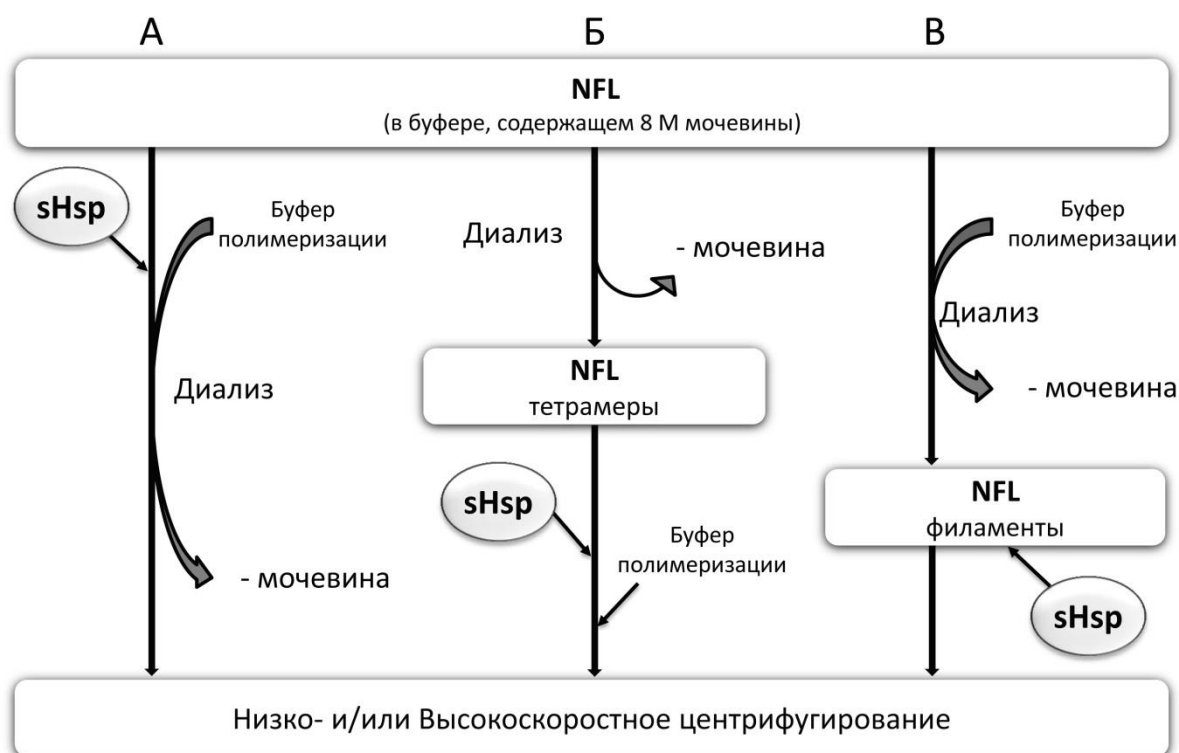


Рис. 9. Схема получения филаментов NFL и опытов по изучению их взаимодействия с малыми белками теплового шока.

5.5.2. Электронная микроскопия

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. Электронную микроскопию проводили на микроскопе JEOL 2100 TEM при ускоряющем напряжении 200 кВ. Автор выражает глубокую благодарность д.б.н., профессору РАН О.С. Соколовой (кафедра биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова) за помощь в проведении экспериментов по электронной микроскопии.

5.5.3. Модификация NFL пиренилмалеимидом и использование модифицированного белка для изучения кинетики полимеризации NFL

Перед проведением модификации 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) в течение 30 мин при 30 °C. Для удаления избытка ДТТ препараты подвергали гель-фильтрации на колонке NAP10 (GE HealthCare), уравновешенной буфером U (150 mM фосфат натрия pH 7,4, содержащий 8 M мочевины). Для приготовления буфера U использовали 10 M раствор мочевины, предварительно проинкубированный со смешанным ионообменником в течение 15 мин при комнатной температуре. В работе использовали раствор пиренилмалеимида (PM) с концентрацией 12 mM, приготовленный на диметилформамиде. Для определения концентрации пиренилмалеимида использовали коэффициент молярного поглощения равный $40000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Модификацию белка легкой цепи нейрофиламентов проводили в течение 3 часов при комнатной температуре в темноте при молярном соотношении PM:мономер NFL равном 10:1. Реакцию останавливали добавлением ДТТ до конечной концентрации 5 mM, образцы центрифугировали при 14000 g в течение 15 мин. Избыток PM удаляли гель-фильтрацией на колонках NAP10, уравновешенных буфером U. Модифицированный белок (PM-NFL) концентрировали ультрафильтрацией (MILIPORE 30,000MWCO). Степень модификации определяли спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность при 280 и 344 нм. Степень модификации составляла 0,8-1,2 моль флуоресцентной метки на моль NFL. Спектр флуоресценции препарата PM-NFL регистрировали в диапазоне длин волн 350-600 нм при длине волны возбуждающего света 344 нм на спектрофлуориметре CaryEclipse (Varian). Полученный препарат PM-NFL разделяли на аликвоты и хранили при -70 °C.

Образцы немодифицированного NFL и PM-NFL диализовали в течение ночи против буфера T (5 mM Трис-ацетат pH 8,0, 1 mM ЭГТА), смешивали таким образом, чтобы конечная

степень модификации составляла 0,25-0,50 моль флуоресцентной метки на моль NFL и центрифугировали при 14000 g в течение 15 мин при 4 °С. Образцы с концентрацией белка 0,5-0,7 мг/мл преинкубировали в течение 5 мин при 37 °С, после чего индуцировали полимеризацию NFL добавлением 1/10 объема буфера, содержащего 200 mM HEPES/NaOH pH 7,0, 1,9 M NaCl, 10 mM MgCl₂. Флуоресценцию возбуждали светом с длиной волны 344 нм и регистрировали соотношение флуоресценции при 385 и 470 нм (F_{385}/F_{470}) на протяжении 90 мин. Все измерения проводили при 37 °С на спектрофлуориметре CaryEclipse (Varian). По окончании полимеризации образцы центрифугировали при 105000 g в течение 60 мин при 4 °С. Состав супернатантов и осадков после центрифугирования анализировали методом электрофореза по методу Леммли [154] (см. 8.3).

5.5.4. Фосфорилирование NFL α АМФ-зависимой протеинкиназой

Фосфорилирование тетрамеров и филаментов NFL (получение см. рис. 9) каталитической субъединицей протеинкиназы А проводили в буфере Р (20 mM Трис, 10 mM фосфат натрия pH 7,5, 15 mM МЭ, 1 mM MgCl₂), содержащем 50-70 μ M АТФ и следовые количества γ -³²P-АТФ. Реакцию начинали добавлением каталитической субъединицы протеинкиназы А. Перед добавлением протеинкиназы отбирали нулевую пробу, далее для анализа кинетики фосфорилирования NFL из реакционной среды отбирали по 10 мкл инкубационной пробы каждые 30 мин в течение двух часов. Аликвоты инкубационной среды наносили на фильтр Whatmann 3MM, высушивали и промывали вначале раствором 10% ТХУ, содержащим 10 mM Na₄P₂O₇, 10 mM NaH₂PO₄, затем водой и спиртом. Фильтры высушивали и определяли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике RackBeta 1219 (LKB). В качестве контроля на общее содержание радиоактивного фосфата отбирали 2 мкл инкубационной среды, наносили на фильтр, и без промывания ТХУ измеряли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике. Анализ включения радиоактивного фосфата в NFL и HspB1 проводили методом автордиографии (см. гл. 8.5).

5.5.5. Изучение взаимодействия малых белков теплового шока с NFL методом аналитического ультрацентрифугирования

Изучение взаимодействия белка легкой цепи нейрофиламентов с малым белком теплового шока HspB1 проводили по двум схемам. В первом варианте изучали взаимодействие HspB1 с промежуточным продуктом полимеризации (тетрамерами) NFL (рис. 9Б). Для получения тетрамеров белка нейрофиламентов препарат NFL (1,4 мг/мл или 22 μ M) диализовали против буфера Т (5 mM Трис/ацетат pH 8,0, содержащий 1 mM ЭГТА) в течение ночи при 4 °С. Затем смешивали с HspB1 (конечная концентрация 22 μ M), проводили

ультрацентрифугирование и рассчитывали коэффициенты седиментации, как это описано в разделе 5.3.1. Во втором варианте эксперимента изучали полимеризацию белка нейрофиламентов в присутствии малого белка теплового шока HspB1 (рис. 9А). Образец NFL (1,4 мг/мл или 22 μ M) смешивали с HspB1 (0,5 мг/мл или 22 μ M), диализовали против буфера полимеризации F (20 mM HEPES/NaOH (pH 7,0), 190 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM ЭГТА, 0,1 mM ФМСФ) в течение ночи при 37 °C и проводили ультрацентрифугирование и необходимые расчеты (см. гл. 5.3.1).

6. Измерение шапероноподобной активности малых белков теплового шока

О шапероноподобной активности судили по способности HspB1 предотвращать агрегацию модельных субстратов. В качестве субстратов использовали лизоцим (Л-м), α -лактальбумин (а-лак), субфрагмент-1 миозина (S1) и лизат клеток линии HEK293F. За агрегацией индивидуальных белков-субстратов (Л-м, а-лак и S1) следили по увеличению оптической плотности при 340 нм (A_{340}) на спектрофотометре Ultrospec 3100 Pro (GE Healthcare).

Агрегацию лизоцима индуцировали восстановлением дисульфидных связей. Эксперименты проводили в 50 mM фосфатном буфере pH 7,4 при концентрации лизоцима 0,3 мг/мл. HspB1 дикого типа и его мутантные формы смешивали с лизоцимом в весовом соотношении HspB1/Л-м равном 1/2. Пробы преинкубировали 5 мин при 37 °C, затем добавляли ДТТ до конечной концентрации 20 mM и регистрировали изменение оптической плотности при 340 нм в течение 60-80 мин.

Агрегацию α -лактальбумина проводили в 50 mM фосфатном буфере pH 7,0, содержащем 100 mM KCl и 2 mM ЭДТА. Концентрация α -лактальбумина в пробе составляла 1,4 мг/мл. HspB1 дикого типа и его мутантные формы смешивали с α -лактальбумином в весовом соотношении 1/4. Пробы преинкубировали 5 мин при 37 °C, затем добавляли ДТТ до конечной концентрации 20 mM и регистрировали изменение оптической плотности при 340 нм в течение 120-200 мин. После завершения эксперимента образцы центрифугировали при 14000 g 10 мин и анализировали белковый состав осадка и супернатанта методом электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН (см. 8.3).

В качестве третьего субстрата, использованного для измерения шапероноподобной активности, был выбран субфрагмент 1 (S1) миозина, который был любезно предоставлен д.б.н., профессором Д.И. Левицким (Институт биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные

основы биотехнологии» РАН). S1-фрагмент представляет собой фрагмент «моторной» головки миозина, получаемый путем протеолиза интактного белка химотрипсином. Агрегацию S1 проводили в 20 mM HEPES/NaOH pH 7,0, содержащем 115 mM NaCl, 15 mM МЭ. В пробу, объемом 300 мкл, вносили 150 мкл двукратного буфера, S1-фрагмент миозина до конечной концентрации 0,48 мг/мл, HspB1 дикого типа или его мутантные формы до конечной концентрации 0,24 мг/мл и доводили объем до 300 мкл буфером В. Таким образом, весовое соотношение HspB1/S1-фрагмент миозина составляло 1/2. Агрегацию S1-фрагмента индуцировали нагреванием образцов до 43 °C и регистрировали изменение оптической плотности при 340 нм в течение 120 мин.

Для использования лизата клеточных белков в качестве субстрата клетки линии НЕК293F культивировали, как описано в «Материалах и методах» гл. 5.4. При достижении конфлюэнтного монослоя клетки снимали с подложки и суспендировали в буфере PBS, содержащем 1 mM ДТТ. Полученную суспензию клеток подвергали ультразвуковой обработке на дезинтеграторе Branson S250D (выходная мощность 10%) 2 раза по 30 сек на льду и центрифугировали при 105000 g, 4 °C в течение 1 часа. В супернатанте после центрифугирования измеряли и концентрацию белка методом Бредфорда (см. 8.2). Пробы, содержащие 0,8 мг/мл тотального белка и 0,1-0,5 μ M (0,002-0,01 мг/мл) HspB1 дикого типа и его мутантных форм инкубировали при 55 °C в течение 1,5 часов. Полученные пробы центрифугировали 14500 g в течение 10 мин при 20 °C. В супернатанте после центрифугирования определяли концентрацию белка методом Бредфорда (см. 8.2)[149]. Белковый состав супернатантов и осадков анализировали методом электрофореза по методу Леммли (см. 8.3)[154].

7. Моделирование структуры малых белков теплового шока

Модельная структура димера α -кристаллиновых доменов HspB1 была сконструирована профессором С.В. Стрелковым (Лаборатория Биокристаллографии департамента Фармацевтических и Фармакологических наук Католического университета г. Левена, Бельгия). Моделирование было проведено на основе рентгеноструктурных данных, полученных на изолированных кристаллиновых доменах HspB1 (PDB ID: 3Q9Q, [6]) и HspB5 (PDB ID: 2WJ7, [14]).

8. Некоторые аналитические методы

8.1. Спектрофотометрическое определение концентрации белков

Определение концентрации белка в пробах проводили по поглощению при 280 нм. Весовые (мг/мл) и молярные коэффициенты поглощения белков приведены в таблице 5.

8.2. Определение концентрации белка по методу Бредфорда

Для определения концентрации белка к 100 мкл раствора, содержащего от 2 до 10 мкг белка, добавляли 1 мл рабочего раствора Кумасси G250, инкубировали 10-20 мин и измеряли оптическое поглощение при 595 нм [149]. В качестве стандарта использовали раствор БСА. Для приготовления рабочего раствора 10 мг Кумасси G250 растворяли в 5 мл 95% этанола, добавляли 10 мл 85% фосфорной кислоты и доводили объем до 100 мл. Полученный раствор фильтровали и хранили в темноте.

Таблица 5. Коэффициенты экстинкции некоторых использованных в работе белков.

Белок	UniProt ID	$A_{280}, (\text{мг/мл})^{-1} \text{ см}^{-1}$	$\epsilon_{280}, \text{М}^{-1} \text{ см}^{-1}$
HspB1	P04792	1,775	40450
HspB5	P02511	0,694	13980
HspB6	O14558	0,582	9970
HspB8	Q9UJY1	1,225	26470
БСА	P02769	0,646	42925
bNFL	P02548	0,587	36790

8.3. Электрофорез в денатурирующих условиях по методу Леммли

Анализ белкового состава проб проводили методом электрофореза в присутствии ДСН по методу Леммли [154]. Для разделения белков использовали 12,5 и 15% ПААГ. При приготовлении образца к 3 объемам исследуемого раствора белка добавляли один объем 4-кратного буфера для образцов (250 мМ трис-НСl, рН 6,8; 40% глицерин, 8% ДСН, 0,004% бромфенолового синего, 15 мМ МЭ) и прогревали при 95 °С в течение 5 мин. На гель наносили от 1 до 5 мкг белка на дорожку. Для приготовления одного 12,5% разделяющего ПААГ (толщина геля 0,75 мм) смешивали 1,65 мл раствора 30% АА, содержащего 0,8% МБА, 0,935 мл буфера для разделяющего геля (1,5 М трис-НСl рН 8,8 0,4% ДСН) и 1,3 мл воды. Полимеризацию индуцировали внесением 2 мкл ТЕМЕД и 40 мкл 5% ПСА. Для приготовления одного 6% концентрирующего ПААГ (толщина геля 0,75 мм) смешивали 0,3

мл раствора 30% АА, содержащего 0,8% МБА, 0,37 мл буфера для разделяющего геля (0,5 М трис-НСl pH 6,8 0,4% ДСН) и 0,8 мл воды. Полимеризацию индуцировали внесением 3 мкл ТЕМЕД и 15 мкл 5% ПСА.

В качестве катодного буфера использовали 0,192 М трис-глицин, pH 8,6, содержащий 0,1% ДСН, а в качестве анодного – 0,25 М трис-НСl, pH 8,6. Электрофорез проводили при силе тока 10 мА на одно стекло до входа бромфенолового синего в разделяющий гель и 20 мА после входа красителя в разделяющий гель (размеры геля 70-95-0,75 мм). Гели фиксировали в растворе 10% уксусной кислоты и 20% изопропанола в течение 10-20 мин, окрашивали 20-30 мин 0,3% раствором Кумасси синего R-250, приготовленного на смеси, содержащей 20% изопропанола и 10% уксусной кислоты, отмывали кипячением и сканировали. Интегральную интенсивность белковых полос определяли в программах ImageJ и GelAnalyzer.

8.4. Электрофорез в присутствии мочевины по методу Перрье-Перри

Для разделения смеси белков по их заряду использовали метод электрофореза в присутствии 8 мочевины [153]. Для приготовления проб смешивали равные объемы образцов исследуемых белков с 2-кратным буфером для образцов (10 мМ Трис-глицин pH 8,6, 8 М мочевины, 5% МЭ, бромфеноловый синий). На 6% ПААГ (8,3 x 6,4 см) наносили 1-5 мкг белка на дорожку. В качестве катодного и анодного буферов использовали 20 мМ трис-глицин pH 8,6. Для приготовления 6 мл 10% ПААГ навеску мочевины (2,9 г) растворяли в 2 мл 30% АА, содержащего 1,6% МБА, добавляли 0,5 мл 12-кратного электродного буфера и доводили объем до 6 мл. Полимеризацию индуцировали внесением 30 мкл ДМАПН и 120 мкл 5% ПСА. Перед нанесением образцов проводили пре-электрофорез при силе тока 12 мА в расчете на гель в течение 30 мин, затем наносили образцы и продолжали электрофорез при силе тока 12 мА в течение 3,5 часов. Гели фиксировали в растворе 10% уксусной кислоты и 20% изопропанола в течение 10-20 мин, окрашивали 20-30 мин 0,3% раствором Кумасси синего R-250, приготовленного на смеси, содержащей 20% изопропанола и 10% уксусной кислоты, отмывали кипячением и сканировали. Интегральную интенсивность белковых полос определяли в программах ImageJ и GelAnalyzer.

8.5. Авторадиография

Анализ включения радиоактивного фосфата в белок после фосфорилирования проводили методом авторадиографии. Гели после окраски высушивали между двумя слоями целлофановой пленки, затем помещали между двумя слоями фотографической пленки Amersham HyperfilmTM MP и оставляли в кассете для авторадиографии Amersham

HypercasseteTM. Время экспозиции зависело от уровня радиоактивности. По окончании экспозиции пленку проявляли раствором, содержащим 0,22% метол, 7,2% сульфит натрия, 0,88% гидрохинон, 0,48% углекислый натрий, 0,4% бромистый калий и фиксировали раствором 26% тиосульфата натрия, содержащего 5% хлористый аммоний.

8.6. Western Blotting

Для анализа экспрессии HspB1 в клетках линии HEK293 использовали метод Western Blotting. После электрофоретического разделения белков в ПААГ (см. 8.3) проводили электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану в течение 30 мин при напряжении 100В. В качестве буфера для электропереноса использовали 192 мМ глицин-трис буфер pH 8,3, содержащий 10% этанол. За эффективностью переноса следили, используя окрашенные белки-стандарты (ColorPlus Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 кДа), NEB или Novex Sharp Pre-stained Protein standards (3,5-260 кДа), Invitrogen). Мембрану инкубировали в буфере TBST (10 мМ трис-HCl, pH 7,6, 15 мМ NaCl, 0,1% Tween-20), содержащем 5% сухого обезжиренного молока (TBSTM), в течение 20 мин. Затем инкубировали с первичными моноклональными антителами к HspB1 в буфере TBSTM в течение 30 мин, промывали 5-6 раз по 5 мин буфером TBSTM и переносили в раствор вторичных антител (IgG anti-mouse), конъюгированных с пероксидазой хрена и инкубировали в течение 30 мин. Затем отмывали мембрану 6 раз этим же буфером и проводили выявление полос либо с использованием набора для ECL (HRP Chemiluminescent Substrate Reagent Kit, Invitrogen), либо, инкубируя мембрану в 50 мМ трис-HCl, pH 7,5, содержащем 0,6 мг/мл диаминобензидин (ДАБ), 0,03% NiCl₂ и 0,03% H₂O₂. Первичные моноклональные антитела к малому белку теплового шока HspB1 были любезно предоставлены профессором, д.б.н. А.Г. Катрухой, моноклональные антитела к тубулину (DM1A, Invitrogen) были предоставлены к.б.н. А.В. Харитоновым.

Результаты исследования

1. Получение препаратов малого белка теплового шока HspB1 дикого типа и его точечных мутантов

Рекомбинантный HspB1 дикого типа и его мутантные формы с заменами G84R, L99M, R140G и K141Q получали в бактериальной системе экспрессии (рис. 10). Клетки *E.coli* штамма BL21(DE3)pLysS трансформировали плазмидами, содержащими кодирующие последовательности HspB1 WT и его мутантных форм. Синтез белка индуцировали добавлением в среду IPTG. Экспрессия HspB1 дикого типа и его мутантных форм сопровождалась накоплением рекомбинантного белка, который в основном находился в растворимом виде (рис. 10А). Поэтому после разрушения бактериальных клеток было достаточно провести две экстракции лизис-буфером чтобы практически полностью проэкстрагировать исследуемый белок (рис. 10Б ср. дорожки C1, O2 и C2). Супернатанты, полученные после двух экстракций, объединяли и проводили высаливание целевого белка сульфатом аммония в интервале 0-40% насыщения (дорожки C_{CA} и O_{CA}, рис. 10Б). Осадок (O_{CA}) растворяли в буфере В и проводили дальнейшую очистку HspB1 дикого типа и мутантных форм методом ионообменной хроматографии на колонке HiTrap Q (рис. 11 А, Б).

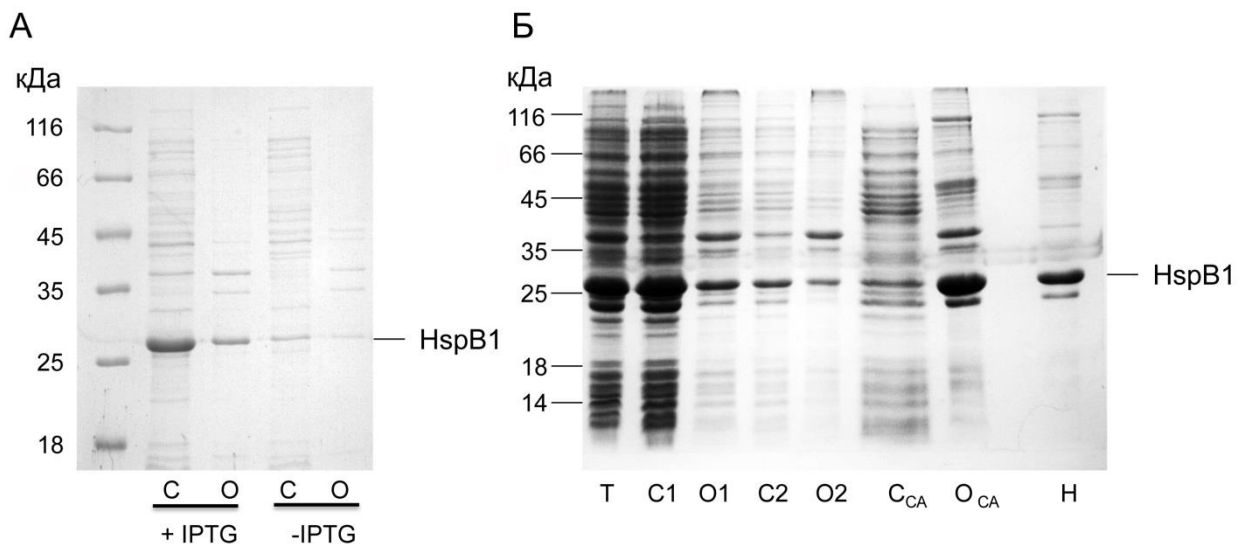


Рис. 10. А. Экспрессия белка HspB1 с заменой L99M в клетках *E.coli* BL21(DE3)pLysS. -IPTG – фракции до индукции синтеза; +IPTG – фракции после индукции синтеза; С – фракция растворимых белков; О – фракция нерастворимых белков. Б. Белковый состав фракций на начальных этапах выделения белка HspB1 L99M. Т – фракция всех растворимых белков бактериального лизата, C1 – супернатант после первой экстракции, O1 – осадок после первой экстракции, C2 – супернатант после второй экстракции, O2 – осадок после второй экстракции, C_{CA} – супернатант после высаливания белков сульфатом аммония, O_{CA} – осадок после высаливания белков сульфатом аммония, Н – препарат, используемый для дальнейшей очистки методом ионообменной хроматографии. Положение HspB1 отмечено линией.

HspB1 WT и мутантные формы прочно сорбировались на колонке и элюировались при повышении ионной силы в виде асимметричного пика (рис. 11А, пик ЭI). Фракции, содержавшие наибольшее количество HspB1 (рис. 11Б, фракции пика ЭI), объединяли и концентрировали. Фракции пика ЭII содержали бактериальную хлорамфениколацетилтрансферазу (ClAc), идентифицированную методом масс-спектрометрии. Дальнейшую очистку белка проводили методом гель-фильтрации. На рис. 11В представлен профиль элюции белков на колонке HiLoad 26/60 Superdex 200 и электрофореграмма отобранных фракций. Как было сказано ранее, для HspB1 характерно образование высокомолекулярных олигомеров, поэтому целевой белок элюировался в начале профиля элюции (пик элюции с объемом около 130 мл). Метод гель-фильтрации позволил очистить препарат целевого белка от примесей ClAc и других белков (рис. 11В, врезка). Фракции, обогащенные целевым белком (рис. 11В, врезка, дорожки 121-133), объединяли, концентрировали и хранили при -20 °С. Таким образом, были получены препараты HspB1 дикого типа и его точечных мутантных форм. Выход белка с 1 л бактериальной культуры составлял 20-40 мг белка. По данным электрофореза в присутствии ДСН чистота всех полученных препаратов белка была не менее 95% (рис. 12).

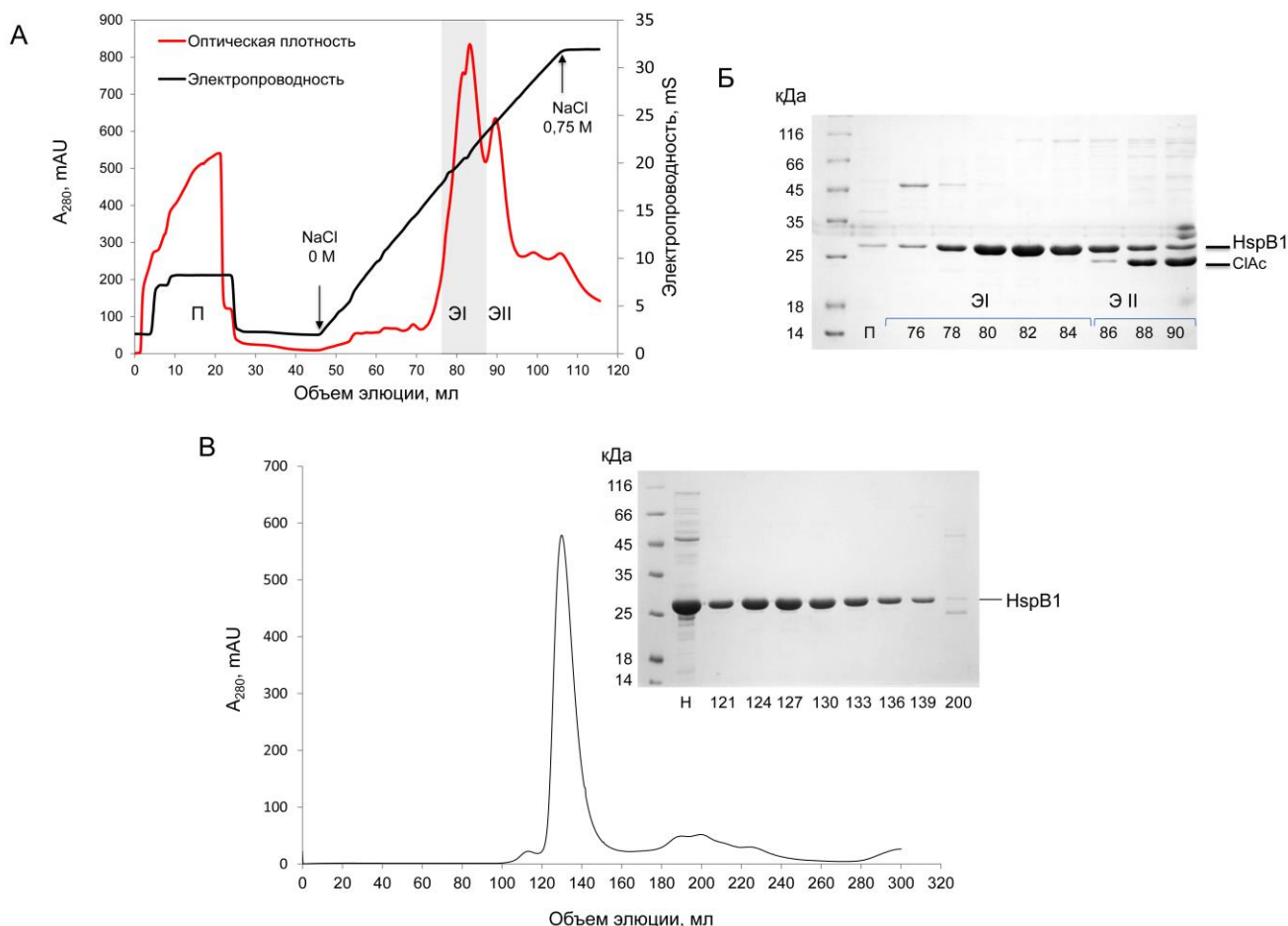


Рис. 11. Хроматографическая очистка HspB1 с точечной заменой L99M. А. Профиль элюции белков при ионообменной хроматографии на колонке HiTrap Q. Стрелками обозначены начало и конец градиента NaCl. П – фракция белков, не сорбировавшихся на носителе (проскок), Э I и Э II – первый и второй пики при элюции белков градиентом NaCl. Положение фракций, обогащенных белком HspB1, отмечено серым цветом. **Б. Белковый состав фракций после ионообменной хроматографии на колонке HiTrap Q.** Представлена электрофореграмма после ДСН-электрофореза фракций. Номера дорожек соответствуют объемам элюции фракций на профиле, представленном на панели А. ClAc – хлорамфениколацетилтрансфераза. **В. Профиль элюции HspB1 с точечной заменой L99M на колонке HiLoad 26/60 Superdex 200.** Во врезке представлена электрофореграмма белкового состава фракций после гель-фильтрации. Номера дорожек соответствуют объемам элюции на профиле.

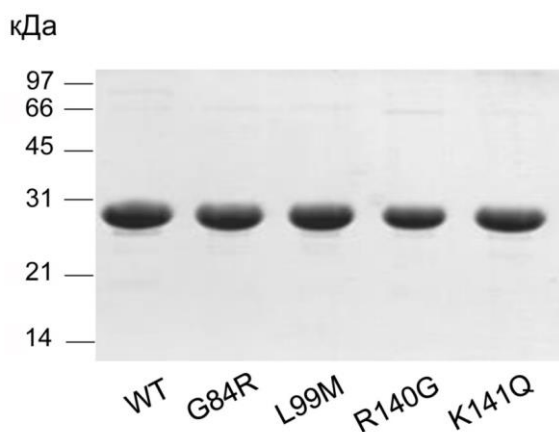


Рис. 12. Анализ чистоты полученных препаратов HspB1 дикого типа и его мутантных форм методом электрофореза в присутствии ДСН.

2. Структура и свойства мутантных форм HspB1

2.1. Использование метода ограниченного протеолиза для исследования структуры белков

Метод ограниченного протеолиза довольно часто применяется для анализа структуры белка [13, 155]. Анализируя доступность пептидных связей для различных протеаз можно получить информацию об изменениях в структуре белка, вызванных а.к. заменами. При использовании данного метода необходимо подобрать условия, в которых скорость расщепления белка была бы сравнительно невысокой, что позволило бы выявить различия в доступности различных участков белка для используемой протеазы. В качестве протеазы мы использовали трипсин, который гидролизует пептидные связи, образованные остатками Arg или Lys (рис. 13). В ранее опубликованной работе Баранова и соавт. установили, что полный трипсинолиз HspB1 сопровождается образованием устойчивых к трипсинолизу пептидов, ограниченных остатками 5-56 (N-концевой домен) и остатками 90-171 (α -кристаллиновый домен) (рис. 13Е) [156]. Как видно на рис. 13А, в выбранных нами условиях ограниченный протеолиз HspB1 дикого типа и всех его мутантных форм сопровождается накоплением одинакового набора пептидов с кажущимися молекулярными массами 24,0, 18,5 и 16,0 кДа. Методом масс-спектрометрии мы установили, что указанные пептиды ограничены остатками R5/V6-R188 (пептид с M_r 24 кДа), Q80-R205 (пептид с M_r 18,5 кДа), и Q80-R188 (пептид с M_r 16,0 кДа) (рис. 13Е). Таким образом, наибольшей доступностью обладают пептидные связи, образованные остатками R4(5), R79 и R188 (рис. 13Е). Как видно на рис. 12А-Д, скорость убыли полосы интактного белка оказалась практически одинаковой для белка дикого типа и всех его мутантных форм. Однако гидролиз пептидов с кажущимися молекулярными массами 24,0 и 18,5 кДа протекает по-разному. Как набор пептидов, так и скорость их появления и последующей убыли (или полного исчезновения) практически одинаковы для белка дикого типа и для G84R и L99M мутантных форм. При длительном трипсинолизе (до 120 мин) белка дикого типа происходит практически полное исчезновение пептидов с M_r 24,0 и 18,5 кДа. В тоже время в случае белка с заменой K141Q даже после длительного протеолиза указанные пептиды удается выявить на электрофореграмме (рис. 13Д). Напротив, в случае мутанта R140G скорость исчезновения указанных триптических фрагментов заметно выше, чем в случае белка дикого типа (рис. 13Г). Представленные данные могут означать, что замена R140G сопровождается общей дестабилизацией структуры белка и способствует более быстрому гидролизу по остаткам R79 и R188. В тоже время замена соседнего аминокислотного остатка K141, наоборот, приводит к некоторой стабилизации структуры белка и ингибирует трипсинолиз пептидной связи, образованной остатком R79.

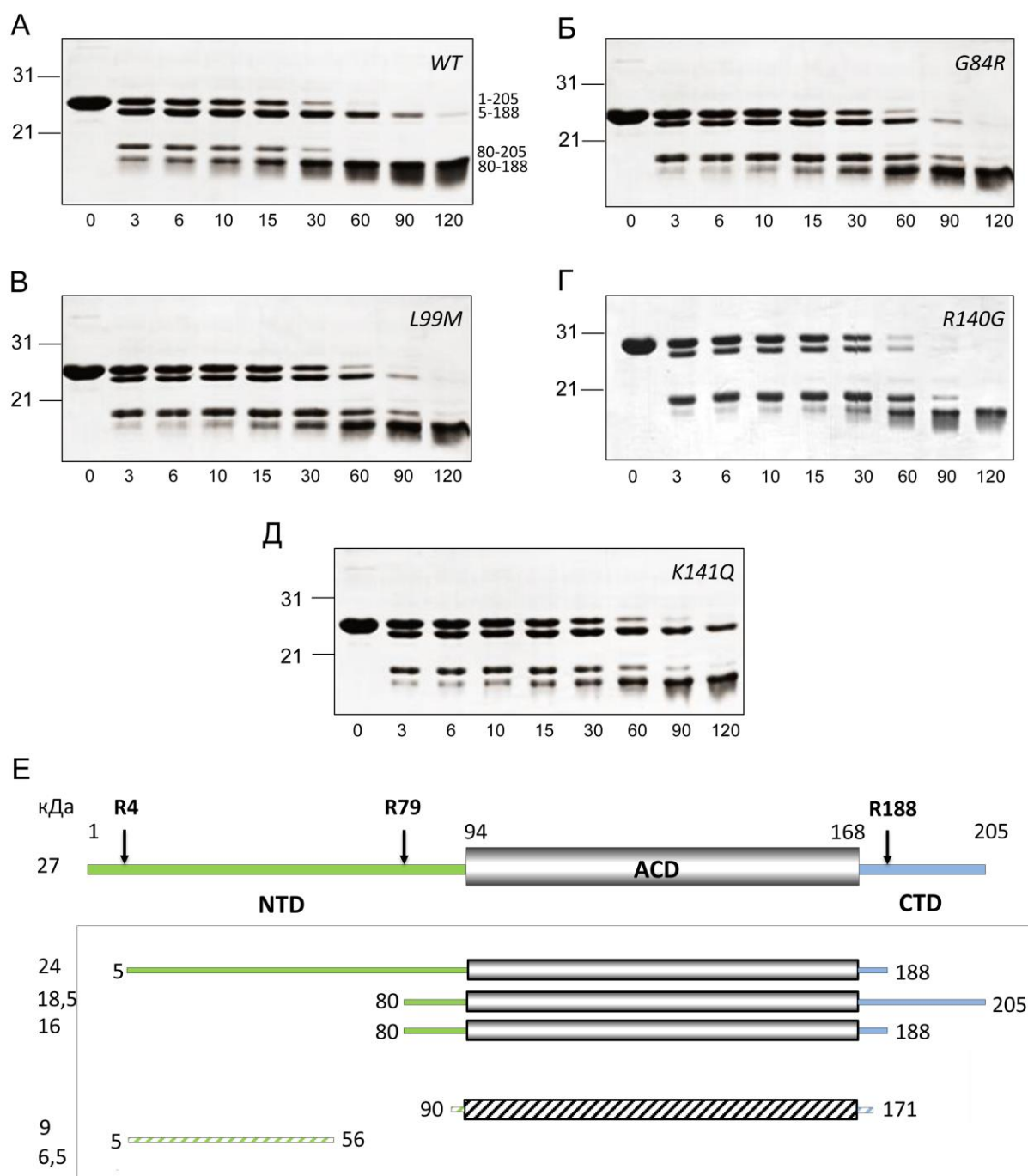


Рис. 13. Ограниченный трипсинолиз HspB1 дикого типа и его мутантных форм. А-Д – электрофореграммы образцов после инкубации с трипсином. Весовое соотношение HspB1/трипсин составляло 8000/1. Номера под дорожками соответствуют времени инкубации с трипсином (мин). Положение белков-маркеров отмечено слева от электрофореграмм. На панели А справа от электрофореграммы указаны номера аминокислотных остатков, входящих в состав соответствующих протеолитических фрагментов. Е. Схема протеолиза HspB1 дикого типа и его мутантных форм, полученная на основе данных масс-спектрометрического анализа пептидов, указанных на панели А. Кажущиеся молекулярные массы протеолитических фрагментов по данным электрофореза по методу Леммли указаны слева (в кДа). Штриховкой показаны протеолитические фрагменты, идентифицированные Барановой и соавт. [156].

2.2. Анализ структуры HspB1 дикого типа и его мутантных форм спектральными методами

2.2.1. Влияние точечных аминокислотных замен на параметры собственной триптофановой флуоресценции

Одним из методов, позволяющих получить информацию о структуре белка, является флуоресцентная спектроскопия. Собственная флуоресценция белка в основном определяется спектральными свойствами остатков триптофана. Согласно модели дискретных состояний выделяют пять основных спектральных форм триптофана (A,S,I,II,III), различающихся по положению максимума флуоресценции [157, 158]. Помимо положения максимума спектры флуоресценции различаются по интенсивности, которая зависит от гидрофобности окружения остатков триптофана и наличия (или отсутствия) различных групп-тушителей. HspB1 содержит 6 остатков триптофана, пять из которых расположены в неупорядоченной N-концевой области белка, а один – в β 3-складке α -кристаллинового домена (рис. 14А).

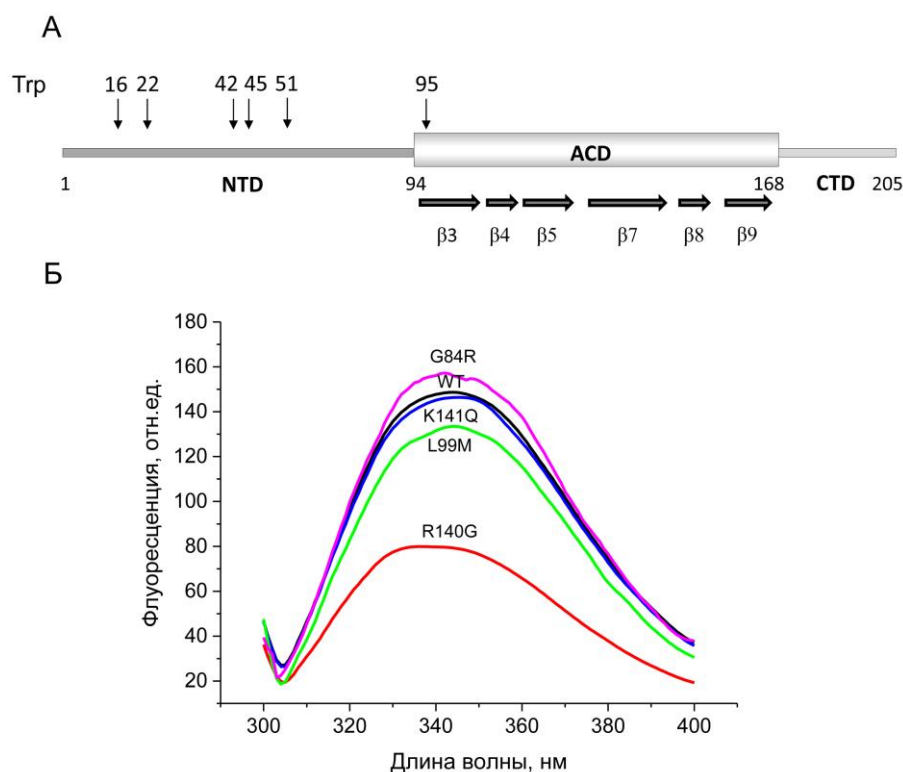


Рис. 14. А. Схема расположения остатков триптофана в первичной структуре HspB1. NTD – N-концевой домен; ACD – α -кристаллиновый домен; CTD – С-концевой домен. Стрелками под схемой обозначено положение β -складок. Б. Спектры собственной триптофановой флуоресценции HspB1 дикого типа и мутантных форм.

Анализируемые аминокислотные замены по-разному влияют на амплитуду флуоресценции. Так замена K141Q не влияет, а замены L99M и G84R лишь незначительно уменьшают (L99M) или незначительно увеличивают (G84R) интенсивность триптофановой флуоресценции HspB1. В тоже время замена R140G снижает интенсивность флуоресценции примерно вдвое (рис. 14Б). Как видно на рис. 14Б, для спектров флуоресценции HspB1 дикого типа и всех анализируемых мутантных форм характерен широкий максимум, расположенный при 336-350 нм. При этом форма спектра флуоресценции белка HspB1 с заменой R140G отличается от формы спектра флуоресценции остальных белков и имеет плато в области 330-344 нм. Пять из шести триптофанов HspB1 находятся в N-концевом домене, ответственном за формирование олигомеров. Альтернативные модели устройства крупных олигомеров sHsp млекопитающих предполагают, что N-концевые домены либо находятся внутри сферы олигомеров sHsp, либо на ее поверхности [32, 33]. Тем не менее, в обоих случаях именно взаимодействие N-концевых доменов обеспечивает ассоциацию гексамеров sHsp. Основываясь на данных моделях, можно предположить, что замена R140G приводит к дестабилизации структуры и нарушению сборки олигомеров, в результате которой N-концевые домены оказываются экспонированными в растворитель, что сопровождается тушением и изменением спектра флуоресценции. Аминокислотный остаток R140 высоко консервативен среди малых белков теплового шока и играет исключительно важную роль в стабилизации структуры белка. По данным литературы точечная замена гомологичного аминокислотного остатка α B-кристаллина (R120G) также приводит к уменьшению интенсивности собственной триптофановой флуоресценции по сравнению с α B-кристаллином дикого типа [159].

Мутированный остаток G84 располагается в мало упорядоченном N-концевом участке и сравнительно удален от ближайших остатков триптофана. Остаток L99 расположен в непосредственной близости от Trp95, однако замена одной гидрофобной аминокислоты на другую, по всей видимости, не оказывает существенного влияния на окружение триптофанилов и их флуоресценцию. Аминокислотный остаток K141 расположен в α -кристаллиновом домене и опять же удален от остатков триптофана в первичной структуре белка. Важно отметить, что, несмотря на соседнее с консервативным R140 положение, замена K141Q не приводит к изменению собственной флуоресценции белка.

Модель дискретных состояний предполагает существование 5 классов остатков триптофана, отличающихся расположением в структуре белка и, как следствие, положением максимума флуоресценции [158]. Зарегистрированные нами спектры флуоресценции имеют широкий максимум в диапазоне 330-350 нм, что приводит к высокой погрешности при определении вклада каждой из спектральных форм триптофана. Однако форма спектра

флуоресценции позволяет заключить, что, флуоресценция всех исследованных белков в основном определяется остатками триптофана второй (II) спектральной группы, т.е. остатками, расположенными на поверхности белковой глобулы и контактирующими с молекулами связанной воды, подвижность которых меньше подвижности свободной воды. Две другие спектральные формы (I и III), вклад которых в спектр HspB1 также возможен, соответствуют остаткам триптофана, локализованным внутри белковой глобулы (спектральная форма I, максимум флуоресценции при 330-332 нм), и остаткам триптофана, расположенным на поверхности белка в контакте с молекулами свободной воды (спектральная форма III, максимум флуоресценции при 350-353 нм) [157].

2.2.2. Использование флуоресцентной спектроскопии для исследования термической денатурации белков

Изучение температурной зависимости собственной триптофановой флуоресценции белка позволяет получить информацию о стабильности его структуры. В ходе тепловой денатурации происходят существенные изменения окружения остатков триптофана. При нагревании также увеличивается вероятность столкновения молекул воды с возбужденными остатками триптофана, что приводит к тушению флуоресценции. В ходе одного цикла нагревания-охлаждения повышение температуры с 20 до 80 °C сопровождается монотонным уменьшением флуоресценции (рис. 15А), а при возврате температуры от 80 к 20 °C происходит увеличение триптофановой флуоресценции, что говорит о ренатурации белка. В тоже время, после одного цикла нагревания-охлаждения не происходит полного возврата HspB1 к исходной нативной структуре, о чем свидетельствует 1,5-кратное снижение триптофановой флуоресценции HspB1. Аналогичная зависимость была обнаружена для всех мутантных форм HspB1. Любопытно, что по данным литературы образование дисульфидного мостика между двумя Cys137 соседних мономеров в составе димера приводит к стабилизации структуры и полному возврату триптофановой флуоресценции к исходному уровню после цикла нагревания-охлаждения [160].

С помощью метода, предложенного Бушуевой с соавторами [150], был рассчитан параметр завершенности теплового перехода (параметр α , рис. 15Б). Как следует из табл. 6, наибольшей термостабильностью обладает белок дикого типа, а внесение точечных а.к. замен зачастую сопровождается её существенным уменьшением, что особенно характерно для мутантных форм с заменами R140G и K141Q. Термостабильность исследуемых белков убывает в ряду: WT > G84R > L99M >> R140G≈K141Q. Таким образом, аминокислотная замена R140G приводит к наиболее значительным изменениям, которые сопровождаются общей дестабилизацией структуры и уменьшением стабильности белка, что хорошо согласуется с результатами, полученными при использовании метода ограниченного

протеолиза (см. Результаты гл. 2.1). Белок с заменой K141Q также обладал пониженной термостабильностью, хотя по результатам ограниченного протеолиза проявлял даже несколько большую устойчивость к расщеплению трипсином по остатку R79, чем белок дикого типа. Это кажущееся противоречие можно объяснить тем, что изменение триптофановой флуоресценции от температуры отражает общие изменения структуры белка, потому что суммирует сигналы, приходящие от различных остатков триптофана, расположенных на большом протяжении полипептидной цепи. В тоже время определение устойчивости к протеолизу позволяет выявить локальные изменения структуры, происходящие вблизи конкретного (R79) остатка аргинина в структуре белка.

Таблица 6. Температуры полуперехода, определенные при исследовании термостабильности HspB1 дикого типа и его мутантных форм (среднее $\pm$ стандартное отклонение по 3 опытам).

Белок HspB1	Температура полуперехода, °C
WT	$69,8 \pm 0,2$
G84R	$68,8 \pm 0,1$
L99M	$67,9 \pm 0,2$
R140G	$64,0 \pm 0,2$
K141Q	$63,9 \pm 0,1$

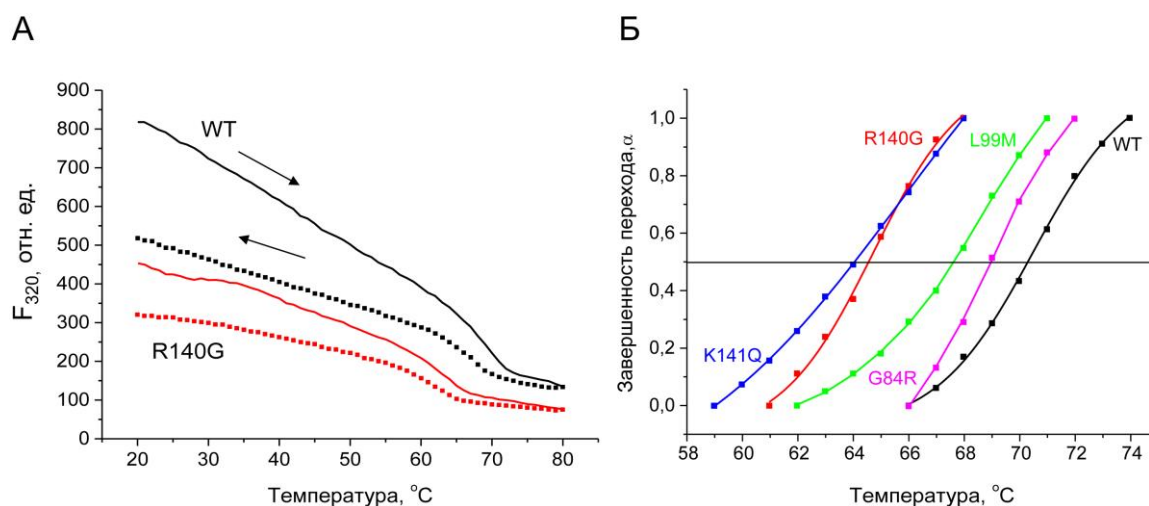


Рис. 15. Исследование термостабильности HspB1 дикого типа и его мутантных форм по зависимости собственной триптофановой флуоресценции от температуры. **А.** Зависимость триптофановой флуоресценции HspB1 дикого типа (черная линия) и его мутантной формы с заменой R140G (красная линия) от температуры. Стрелками показано направление изменения температуры. **Б.** Зависимость завершенности перехода при тепловой денатурации от температуры для HspB1 дикого типа и его мутантных форм.

2.2.3. Изучение гидрофобных свойств белков с помощью флуоресцентного зонда bis-ANS

Одним из важных свойств sHsp является их шапероноподобная активность. Считается, что один из возможных механизмов осуществления данной активности – это гидрофобное взаимодействие малых белков теплового шока с белками-субстратами [161]. Для исследования гидрофобных свойств HspB1 дикого типа и его мутантных форм был использован флуоресцентный зонд bis-ANS (рис. 16А). В свободном состоянии bis-ANS обладает очень низкой флуоресценцией, а при связывании с гидрофобными участками белка флуоресценция при 495 нм резко возрастает. Титрование исследуемых белков bis-ANS сопровождалось увеличением интенсивности флуоресценции при 495 нм (рис. 16Б), при этом интенсивность собственной белковой флуоресценции, возбуждаемой при 295 и регистрируемой при 340 нм, значительно убывала (рис. 16В). Этот эффект может быть связан с несколькими причинами. Во-первых, добавление bis-ANS, обладающего существенным поглощением при 295 нм, приводит к уменьшению интенсивности света, возбуждающего флуоресценцию триптофана. Во-вторых, спектр флуоресценции триптофана частично перекрывается со спектром возбуждения bis-ANS поэтому становится возможным процесс переноса энергии с остатков триптофана на связанный с белком bis-ANS. Как видно на рис. 16Б, кривая титрования всех исследуемых белков имеет одинаковый вид, однако достигаемое значение максимальной флуоресценции отличается у белка дикого типа и его мутантных форм. Представленные данные свидетельствуют о том, что точечная замена K141Q не влияет на гидрофобные свойства HspB1. Замены G84R, L99M незначительно уменьшают гидрофобность белка. В тоже время максимальная флуоресценция bis-ANS, связанного с мутантной формой белка HspB1 R140G (красная линия) была значительно меньше флуоресценции зонда, связанного с белком дикого типа. Таким образом, гидрофобность участков связывания bis-ANS в HspB1 убывает в ряду: WT = K141Q > L99M > G84R > R140G. Исходя из того, что основой шапероноподобной активности sHsp являются гидрофобные взаимодействия, можно предположить, что мутантная форма белка с заменой R140G должен обладать меньшей шапероноподобной активностью, чем белок дикого типа.

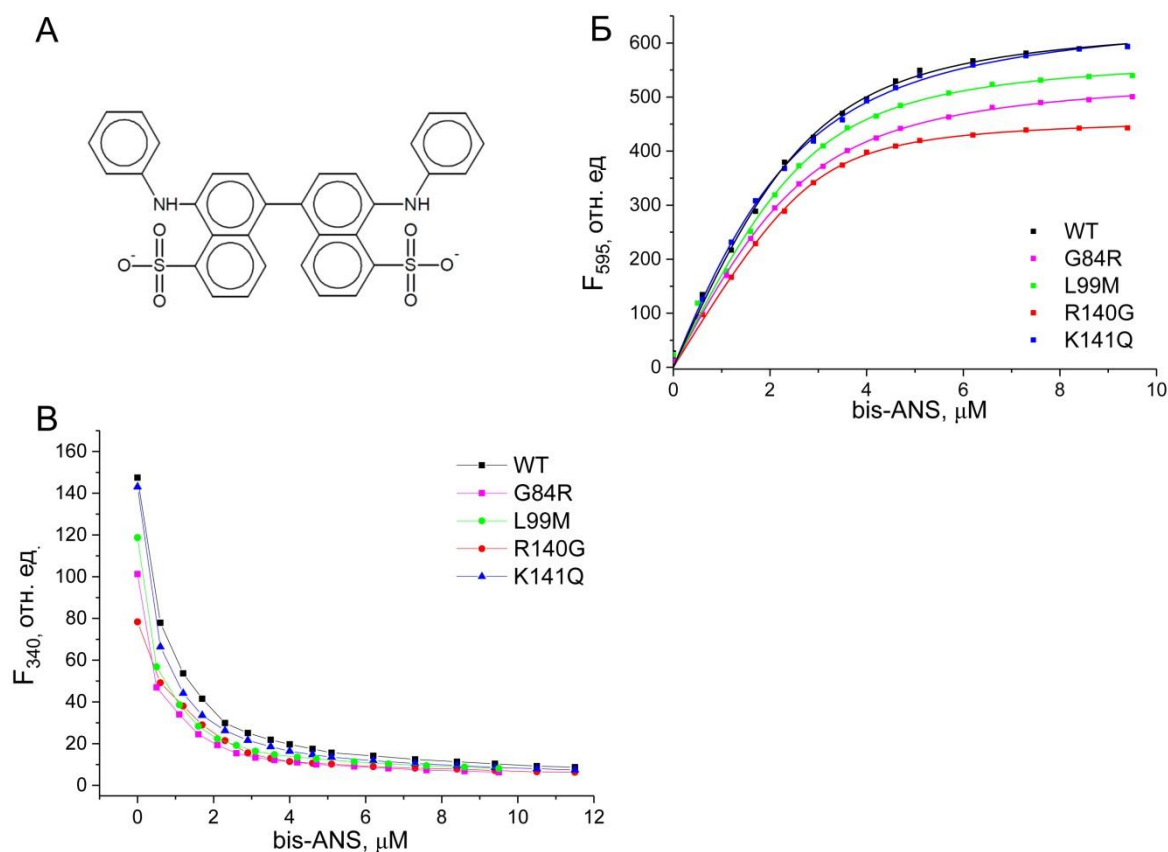


Рис. 16. Исследование гидрофобности HspB1 дикого типа и его мутантных форм с помощью флуоресцентного зонда bis-ANS.

А. Формула флуоресцентного зонда bis-ANS. **Б.** Изменение флуоресценции при 495 нм при титровании образцов HspB1 раствором bis-ANS. **В.** Изменение собственной триптофановой флуоресценции образцов при длине волны 340 нм при титровании образцов HspB1 раствором bis-ANS. Представлены усредненные по трем независимым экспериментам кривые титрования.

2.3. Четвертичная структура и белок-белковые взаимодействия в гомо- и гетероолигомерах малых белков теплового шока

2.3.1. Анализ четвертичной структуры HspB1 и его мутантных форм

По данным литературы малый белок теплового шока HspB1 представлен гомоолигомерами, состоящими из разного количества субъединиц с кажущейся молекулярной массой, колеблющейся от 600 кДа до 1 мДа [16]. В связи с тем, что анализируемые а.к. замены могли влиять на четвертичную структуру белка, мы обратились к исследованию олигомерного состояния HspB1 дикого типа и его мутантных форм с использованием нескольких различных методов. Метод гель-фильтрации позволяет определить кажущуюся молекулярную массу белков. Для изучения стабильности образующихся олигомеров HspB1 дикого типа и его точечных мутантных форм на колонку

Superdex 200 наносили различные количества белка (от 10 до 120 мкг). Оказалось, что вне зависимости от количества наносимого белка, HspB1 дикого типа элюировался в виде симметричного пика с объемом элюции 10,35 мл, что соответствует кажущейся молекулярной массе ~560 кДа (рис. 17 WT, табл. 7). Представленные результаты означают, что HspB1 WT образует стабильные олигомеры, которые не диссоциируют при разведении. Аналогичную картину наблюдали при анализе четвертичной структуры мутантной формы белка с заменой K141Q (рис. 17 K141Q, табл. 7). Однако при нанесении на колонку малых количеств этого белка на профиле элюции выявляется размытый пик с объемом элюции ~14,0 мл (M_r 80 кДа). Таким образом, белок с точечной заменой K141Q также образует высокомолекулярные гомоолигомеры, характерные для белка дикого типа, однако олигомеры этого белка менее стабильны и при сильном разведении частично диссоциируют (вероятно, до димеров или тетрамеров).

Четвертичная структура остальных белков существенно отличается от структуры белка дикого типа. Для белка с заменой G84R характерно наличие двух выраженных пиков элюции с объемами ~10 и 14 мл (рис. 17 G84R, табл. 7). По мере увеличения количества белка, наносимого на колонку, пик с меньшей молекулярной массой (объем элюции 14 мл) практически полностью исчезал, а пик с объемом элюции ~10 мл, напротив, резко возрастал. При этом увеличение количества белка, наносимого на колонку, сопровождалось сдвигом пика элюции в сторону меньших объемов элюции. Представленные данные означают, что при высоких концентрациях мутантная форма G84R образует олигомеры (или агрегаты), размеры которых больше размеров олигомеров белка дикого типа, а при низких концентрациях эти олигомеры склонны к диссоциации с образованием малых олигомеров. Аналогичные результаты были получены при исследовании HspB1 с заменой L99M, который образует олигомеры с кажущимися молекулярными массами 50-70 и 560-580 кДа. По-видимому, этот белок более склонен к диссоциации, чем белок с заменой G84R. При нанесении на колонку любого количества белка на профиле элюции удастся выявить два пика с объемами элюции 14,1-14,3 и 10,1-10,4 мл (рис. 17 L99M, табл. 7). Представленные данные означают, что белок HspB1 L99M представлен смесью высокомолекулярных (до 580 кДа) и низкомолекулярных (50-70 кДа) олигомеров.

На профилях элюции белка с заменой R140G (рис. 17 R140G, табл. 7) при любом количестве наносимого на колонку белка видно два асимметричных пика с объемами элюции 10,1-11,0 (M_r ~450-560 кДа) и 14,0-14,2 мл (M_r ~70 кДа). Положение первого пика зависит от количества белка, наносимого на колонку. Следует отметить, что при нанесении одинаковых количеств белка дикого типа и его мутантной формы с заменой R140G площадь под пиками элюции мутантной формы белка была примерно в 2 раза меньше площади под пиками

элюции белка дикого типа. Этот факт, по всей видимости, означает, что олигомеры R140G склонны к агрегации, и образовавшиеся крупные частицы сорбируются на фильтре и не попадают на колонку. По-видимому, точечная замена R140G сопровождается наибольшей дестабилизацией четвертичной структуры. В ходе выполнения работы мы провели несколько выделений белка HspB1 R140G. Анализ полученных препаратов показал, что при сохранении общей тенденции к диссоциации и агрегации, соотношение форм с большой и малой молекулярной массой может меняться.

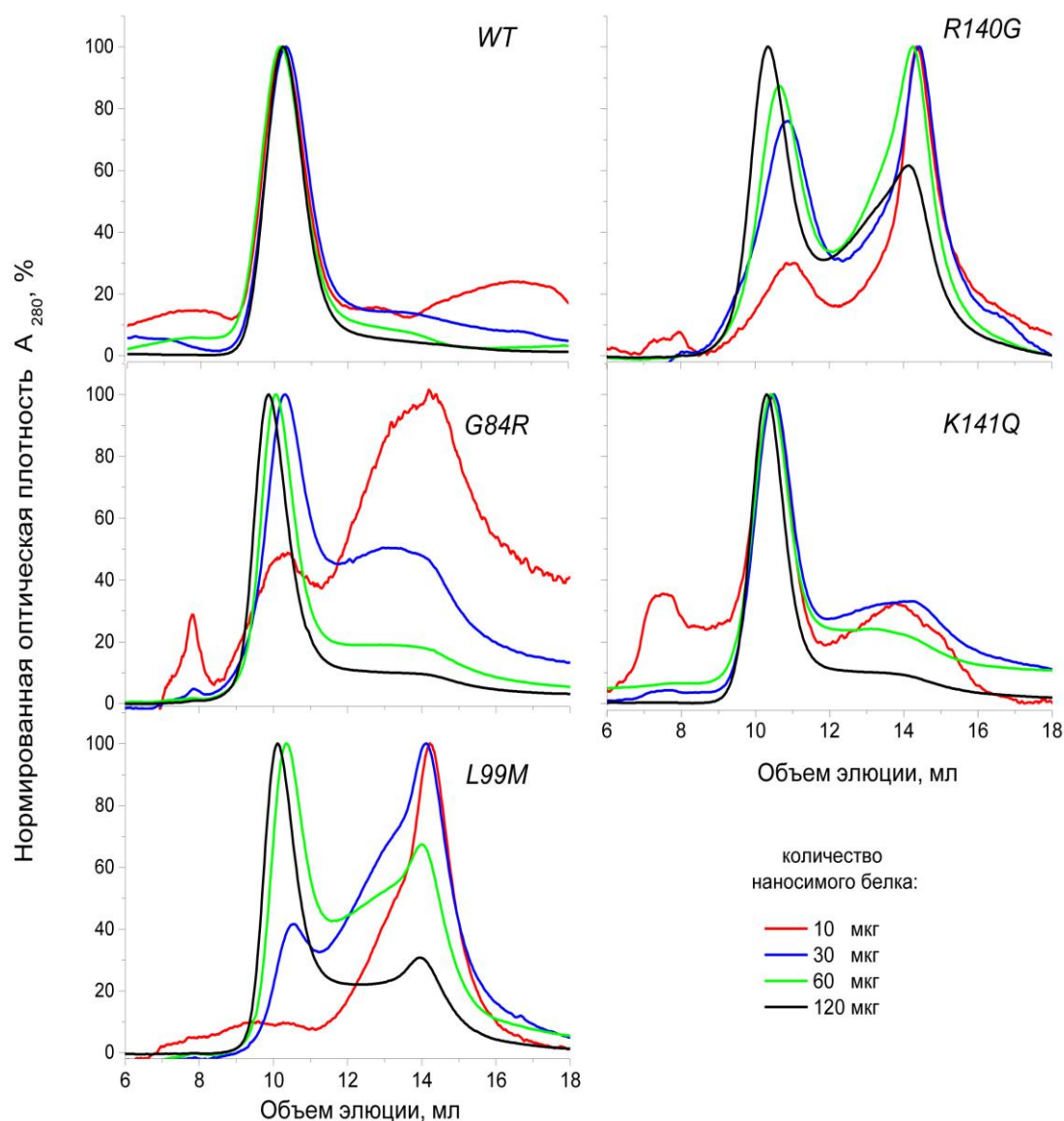


Рис. 17. Исследование четвертичной структуры HspB1 дикого типа и мутантных форм методом гель-фильтрации. Представлены нормированные профили элюции, полученные после гель-фильтрации различных количеств исследуемых белков на колонке Superdex 200 HR 10/30.

Метод гель-фильтрации имеет ряд принципиальных технических особенностей. Например, при прохождении через носитель образец белка сильно разводится, что в случае олигомерных белков может сопровождаться диссоциацией. По этой причине, продолжая исследование четвертичной структуры HspB1 дикого типа и его мутантных форм, мы обратились к методу динамического светорассеяния, позволяющему измерять размер частиц при постоянной концентрации препарата белка. Данный метод основан на изучении динамики рассеяния лазерного света. Крупные медленно подвижные частицы долго не меняют своего положения в растворе, поэтому кинетика затухания рассеянного лазерного света длительное время остается неизменной. В то же время малые подвижные частицы быстро меняют свое положение в растворе и вследствие этого кинетика затухания рассеянного света быстро изменяется. Определяя функцию распределения затухания рассеянного света, можно получить информацию о гидродинамическом размере исследуемых частиц. Как и всякий метод, метод динамического светорассеяния имеет определенные ограничения, и достоверные результаты можно получить только при достаточно высоких концентрациях белка. Кроме того, рассеяние малых по размеру частиц, как правило, дает очень маленький вклад и поэтому малые по размеру частицы оказываются как бы «невидимыми», особенно, если в растворе есть очень крупные частицы.

Таблица 7. Свойства олигомеров HspB1 дикого типа и его мутантных форм, определенные с использованием различных методов.

Белок HspB1	Кажущаяся молекулярная масса, определенная методом гель-фильтрации, кДа	Коэф. седиментации (s)	Диаметр частиц измеренный методом динамического светорассеяния, нм
WT	560	19,9	18,5±0,7
G84R	560-580	26,3	21,5±1,8
L99M	от 50-70 до 580	22,8	20,8±1,3
R140G	от 70 до 450-560, агрегаты	32,0	22,1±2,1
K141Q	560	20,6	19,9±0,6

Результаты измерения гидродинамических размеров HspB1 дикого типа и его мутантных форм представлены в таблице 7. Белок дикого типа и мутантная форма с заменой K141Q имеют схожие размеры, диаметр их олигомеров составляет ~ 19 нм (табл. 7). В тоже время диаметр частиц белка с заменой R140G оказался несколько больше ~ 22 нм. Эти

результаты подтверждают выдвинутое ранее предположение, что HspB1 с заменой R140G склонен к образованию более крупных олигомеров.

Ранее были представлены результаты измерения кажущейся молекулярной массы HspB1 дикого типа методом гель-фильтрации и размера частиц HspB1 методом динамического светорассеяния. Оба эти метода широко распространены при изучении структуры белков. Однако, как ранее упоминалось, при использовании метода гель-фильтрации происходит разведение образца, т.е. кажущаяся молекулярная масса измеряется в условиях низких концентраций белка. При использовании метода измерения динамического светорассеяния концентрация образца остается постоянной, что выгодно отличает этот метод. В тоже время, для изучения гидродинамических параметров белковых частиц при повышенных концентрациях удобен метод аналитического ультрацентрифугирования. При использовании данного метода в ходе центрифугирования происходит постепенное концентрирование белка, что позволяет изучить влияние высоких концентраций на структуру белка. Используя метод аналитического ультрацентрифугирования, мы определили коэффициент седиментации белка дикого типа, равный 19,9 s (табл. 7). Сходный коэффициент седиментации был определен и для белка с точечной заменой K141Q (20,5 s). Коэффициенты седиментации всех остальных мутантных форм HspB1 были больше коэффициента седиментации белка дикого типа (табл. 7). Выявленные ранее закономерности были подтверждены: HspB1 с заменой R140G склонен к агрегации и образованию крупных частиц с коэффициентом седиментации 32 s. Белки с заменами G84R и L99M также образуют частицы несколько большего размера, чем белок дикого типа. Коэффициенты седиментации данных мутантных форм равны 26,3 и 22,8 s, соответственно.

Обобщая данные по исследованию структуры рекомбинатного HspB1 дикого типа и его мутантных форм в условиях *in vitro*, можно заключить, что замена K141Q практически не сказывается на четвертичной структуре HspB1. Три остальные замены G84R, L99M и R140G сопровождаются увеличением размеров крупных олигомеров, формируемых этими белками. Крупные олигомеры мутантных форм больше по размеру, чем соответствующие крупные олигомеры белка дикого типа. Кроме того, крупные олигомеры белка с точечной заменой R140G склонны к агрегации. Одновременно с этим оказалось, что крупные олигомеры (или агрегаты) указанных мутантных форм достаточно неустойчивы и при понижении концентрации белка склонны к диссоциации с образованием малых олигомеров с кажущимися молекулярными массами ~50-70 кДа (вероятно, димерами или тетрамерами), которые выявляются только при использовании метода гель-фильтрации.

Для исследования олигомерного состояния HspB1 дикого типа и его мутантной формы с заменой R140G на клеточном уровне были получены линии клеток HEK293F, стабильно экспрессирующие данные белки (рис. 18). Линия HEK293F была выбрана потому, что клетки данной линии не синтезируют эндогенного HspB1.

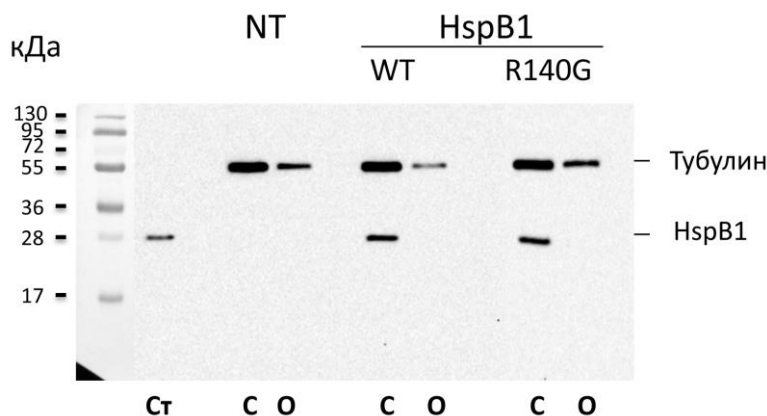


Рис. 18. Экспрессия HspB1 WT и HspB1 с заменой R140G в клетках HEK293F после лентивирусной трансдукции. Анализ синтеза HspB1 WT и HspB1 R140G в клеточных линиях HEK293F после лентивирусной трансдукции и селекции. NT – нетрансдуцированные клетки линии HEK293F, Ст – стандарт рекомбинантного HspB1, С – белки, растворимые в буфере RIPA, О – белки, нерастворимые в буфере RIPA. Представлен скан нитроцеллюлозной мембраны после детекции HspB1 и тубулина методом Western Blotting.

Методом гель-фильтрации лизатов с последующей детекцией HspB1 методом Western Blotting было исследовано распределение различных форм HspB1, отличающихся по своей молекулярной массе (рис. 19). При детекции HspB1 дикого типа и мутантной формы белка HspB1 с заменой R140G во фракциях после гель-фильтрации мы столкнулись с тем, что количества детектируемого белка HspB1 R140G были чрезвычайно малы. Вследствие этого было принято решение перед проведением детекции HspB1 методом Western Blotting переосаждать белки с использованием ТХУ. Таким образом удалось добиться достаточной для детекции концентрации HspB1 в анализируемых образцах (рис. 19 А и Б). Наличие дополнительной стадии переосаждения не вносило изменений в характер распределения HspB1 дикого типа во фракциях после гель-фильтрации (данные не приведены). Распределение HspB1 по профилю элюции (рис. 19А) отражает как распределение собственно HspB1, (который может находиться, как в фосфорилированном (частично диссоциированном), так и в нефосфорилированном (в основном в виде крупных олигомеров) состоянии), так и распределение комплексов HspB1 с белками-партнерами. Тем не менее, учитывая олигомерное состояние HspB1, можно предположить, что пик П1 (рис. 19А), вероятно, соответствует крупным олигомерам нефосфорилированного HspB1. Точно

установить природу и белковый состав проб с кажущимися молекулярными массами в интервале от 400 до 100 кДа невозможно. Остается предположить, что определенная часть HspB1 представлена олигомерами меньшей молекулярной массы и эти олигомеры взаимодействуют с белками-партнерами. При сравнении профилей элюции белка дикого типа и его мутантной формы с точечной заменой R140G видно, что кривая распределения в случае мутантной формы HspB1 сдвинута в область больших объемов элюции (т.е. меньших молекулярных масс), чем в случае белка дикого типа (пик П2 рис. 19 А и Б). Этот факт можно интерпретировать как доказательство того, что в экстракте клеток мутированный белок представлен в основном олигомерами меньших размеров, чем белок дикого типа. Это предположение хорошо согласуется с данными по гель-фильтрации, полученными на изолированных белках (см. рис. 17). Как уже было сказано ранее, несмотря на то, что полученные клеточные линии НЕК293F синтезировали сравнимые количества HspB1 WT и HspB1 R140G (рис. 18), при анализе фракций после гель-фильтрации лизатов удавалось детектировать значительно меньшие количества мутантной формы, чем белка дикого типа (рис. 19 А и Б). В связи с этим, нас заинтересовало, на каком именно этапе подготовки проб происходит «потеря» белка. Подготовка проб к нанесению на гель-фильтрационную колонку включала в себя стадии ультразвуковой обработки суспензии клеток НЕК293F с последующим ультрацентрифугированием при 105000 g. На рис. 19В представлен анализ содержания HspB1 WT и HspB1 R140G во фракциях супернатанта и осадка после ультрацентрифугирования. Как следует из представленных данных, мы не выявили различий в распределении белка дикого типа и его мутированной формы между осадком и супернатантом. Обнаружение HspB1 во фракции осадка, по-видимому, связано с тем, что малый белок теплового шока HspB1 способен взаимодействовать с элементами цитоскелета, которые осаждаются в использованных условиях центрифугирования. Таким образом, уменьшение количества мутантной формы HspB1 во фракциях, полученных после гель-фильтрации, не связано с этапом ультрацентрифугирования. Вероятно, «потеря» мутированной формы белка происходит на фильтре гель-фильтрационной колонки. Ранее, при исследовании олигомерного состояния изолированного белка с точечной заменой R140G мы уже отмечали такую возможность. Таким образом, можно предположить, что с одной стороны точечная мутация R140G сопровождается образованием очень крупных ассоциатов (агрегатов), задерживаемых на фильтре гель-фильтрационной колонки, а с другой стороны точечная замена R140G приводит к повышенной склонности олигомеров к диссоциации и накоплению олигомеров с малой молекулярной массой.

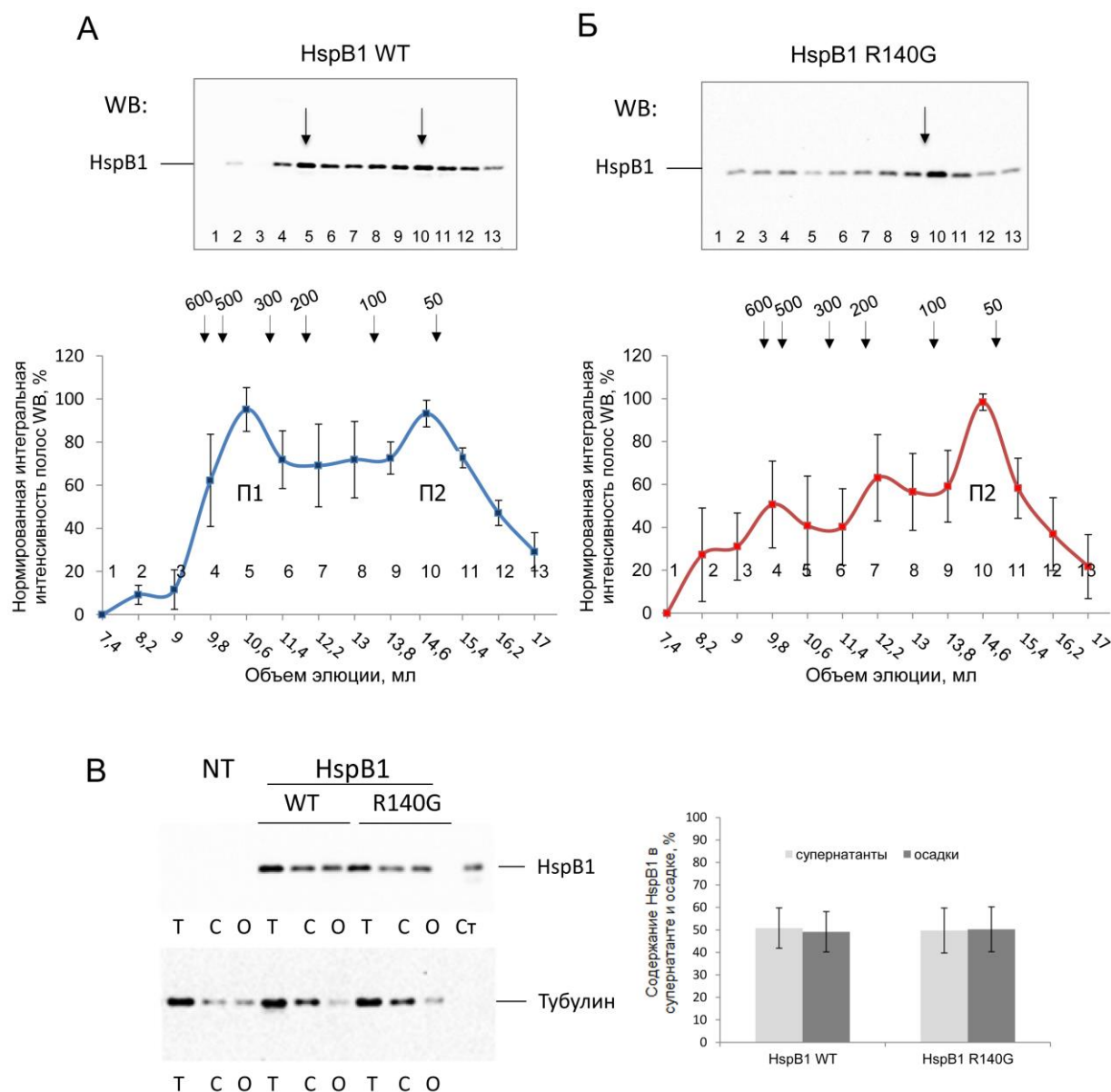


Рис. 19. Анализ распределения HspB1 WT и HspB1 R140G в клеточных лизатах методом гель-фильтрации на колонке Superdex 200 HR 10/30. А-Б. Представлены типичные сканы нитроцеллюлозных мембран после детекции HspB1 в отдельных фракциях, полученных в ходе гель-фильтрации, методом Western Blotting (WB), а также распределения олигомерных форм исследуемых белков по профилю элюции с колонки Superdex 200 с указанием кажущихся молекулярных масс в кДа (отмечены стрелками). На оси ординат отложены средние значения $\pm$ стандартное отклонение, полученное в восьми независимых экспериментах. За 100% принято значение интегральной оптической плотности во фракции с самым высоким содержанием HspB1. В. Анализ распределения HspB1 дикого типа и его мутантной формы с заменой R140G между супернатантами (С) и осадками (О) после ультрацентрифугирования методом Western Blotting. Т – общий белок HspB1 в лизате, Ст – стандарт рекомбинантного белка HspB1 WT, NT – нетрансдуцированные клетки линии HEK293F. Представлен скан нитроцеллюлозной мембраны после детекции HspB1 и тубулина и диаграмма, полученная по результатам обчета интенсивностей полос HspB1. В диаграмме представлены средние значения $\pm$ стандартное отклонение, полученное в трех независимых экспериментах.

К сожалению, однозначная интерпретация полученных результатов затруднена тем фактом, что в ходе гель-фильтрации происходит значительное разведение образца белка. Поэтому переносить результаты, полученные при гель-фильтрации, на условия, характерные для клетки, где концентрация белка очень высока и имеет место т.н. краудинг-эффект (crowding effect) [162], оказывается затруднительным.

2.3.2. Белок-белковые взаимодействия в гетероолигомерах HspB1 дикого типа и мутантной формы с заменой R140G

Для большинства описанных мутаций *HspB1* (кроме L99M) характерно аутосомно-доминантное наследование (см. табл. 2). Это означает, что в клетке одновременно присутствуют и мутантная форма, и белок дикого типа. В связи с этим, закономерен вопрос, возможно ли образование гетероолимеров между белком дикого типа и его мутированными формами. Четвертичная структура белка *HspB1* с заменой R140G наиболее сильно отличается от белка дикого типа. Как было сказано ранее, белок *HspB1* R140G представлен тремя типами олигомеров, а именно, агрегатами, крупными и мелкими олигомерами с кажущимися молекулярными массами ~450-560 кДа и ~70 кДа. При этом четвертичная структура данного белка очень нестабильна и зависит от концентрации белка и может варьировать от препарата к препарату. Именно это отличие позволяет изучать образование гетероолимеров между *HspB1* дикого типа и мутированного белка с точечной заменой R140G методом гель-фильтрации с последующим анализом фракций методами электрофореза в присутствии мочевины [153]. На профиле элюции изолированного *HspB1* дикого типа присутствует единственный пик, соответствующий олигомеру с кажущейся молекулярной массой 560 кДа (рис. 20А, черная кривая). В отличие от этого на профиле элюции белка *HspB1* R140G удается выявить 2 пика, соответствующих олигомерам с кажущимися молекулярными массами ~600 и 70 кДа (рис. 20А, синяя кривая). При гель-фильтрационном анализе эквимоллярных смесей *HspB1* дикого типа и, белка с точечной заменой R140G, преинкубированных при 42 °С (рис. 20А), на профиле элюции выявляются 2 пика с кажущимися молекулярными массами ~560-580 и ~70 кДа. При этом по данным электрофореза в присутствии мочевины по методу Перрье-Перри [153] и белок дикого типа, и мутантная форма *HspB1* присутствуют во всех фракциях анализируемого профиля элюции (рис. 20Б). Как уже было сказано ранее, данный метод электрофореза позволяет разделять белки по их заряду. Замена аргинина на глицин в белке *HspB1* R140G приводит к уменьшению изоэлектрической точки белка. Действительно, расчетная *pI* белка дикого типа составляет 5,98, а белка с заменой R140G – 5,76. Такое изменение изоэлектрической точки оказывается достаточным, чтобы стало возможным разделение белка дикого типа и его мутантной формы при электрофорезе по методу Перрье-Перри (рис. 20Б). 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. Кроме того, белок дикого типа, по всей видимости, обладает выраженным шапероноподобным эффектом и предотвращает агрегацию (и, вероятно, преципитацию на фильтре) крупных агрегатов мутированного белка. Именно по этой причине площадь под пиками смесей двух белков оказывается больше суммы площадей пиков под профилями элюции изолированного белка дикого типа и его мутированной R140G формы.

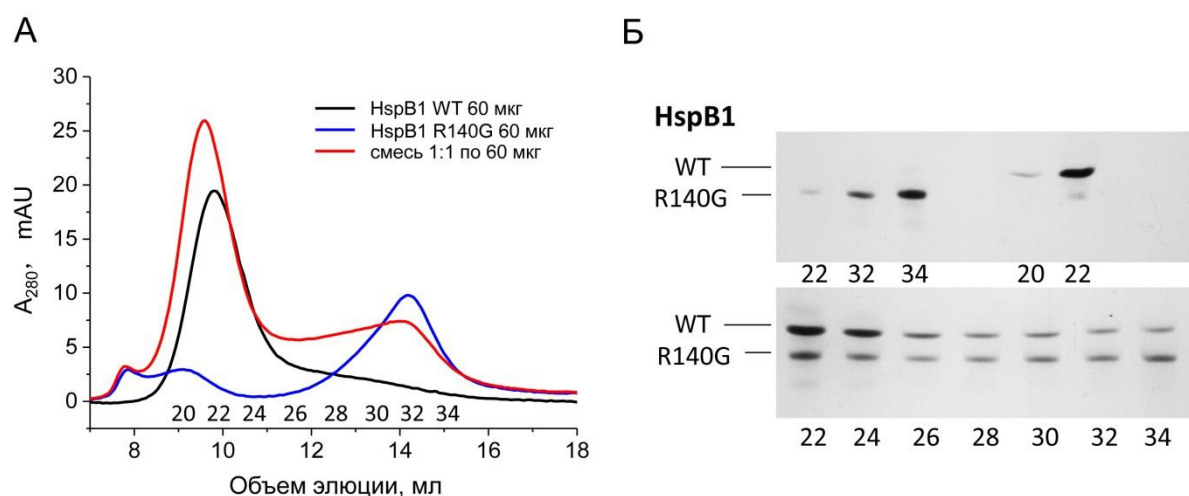


Рис. 20. Образование смешанных олигомеров HspB1 дикого типа и мутантной формы с заменой R140G. А. Профили элюции HspB1 WT, мутантной формы, а также эквимольной смеси этих белков на колонке Superdex 200. Номера под профилями соответствуют номерам дорожек на панели Б. **Б. Электрофореграмма фракций после гель-фильтрации.** Представлены результаты электрофореза в присутствии мочевины по методу Перрье-Перри. На верхней панели представлен белковый состав проб, полученных при гель-фильтрации изолированной мутантной формы белка (R140G) и HspB1 дикого типа (WT), на нижней панели – белковый состав проб, полученных при гель-фильтрации смеси белка дикого типа и его мутантной формы. Положение HspB1 WT и HspB1 R140G отмечено слева от электрофореграмм. Номера дорожек соответствуют номерам фракций на панели А.

Суммируя вышесказанное, можно предположить, что, если в клетке одновременно синтезируются мутантная форма и белок HspB1 дикого типа, то мутантная форма может взаимодействовать с белком дикого типа, образовывать с ним смешанные комплексы и таким образом мешать его нормальному функционированию.

2.3.3. Белок-белковые взаимодействия в гетероолигомерах HspB1 с малым белком теплового шока HspB6

В геноме человека обнаружено 10 генов, кодирующих малые белки теплового шока. Как уже отмечалось, различные малые белки теплового шока могут взаимодействовать между собой, образуя гетероолигомерные комплексы, свойства которых могут отличаться от свойств гомоолигомеров [67]. Одним из потенциальных белков-партнеров HspB1 может быть другой малый белок теплового шока HspB6, экспрессируемый в больших количествах практически во всех органах и тканях человека. В этой связи представлялось целесообразным подробно проанализировать влияние точечных замен на способность HspB1 взаимодействовать с HspB6. Для решения этой задачи был использован метод гель-фильтрации (рис. 21). Возможность использования метода гель-фильтрации для анализа взаимодействия данных белков обусловлена различиями в молекулярных массах их гомоолигомеров. Малый белок теплового шока HspB6 образует малые олигомеры (вероятно, димеры), с кажущейся молекулярной массой 58 кДа [17]. На профиле элюции (рис. 21А, зеленая кривая) HspB6 представлен единственным пиком, объем элюции которого составляет 15 мл. Изолированный HspB1 дикого типа образует крупные олигомеры и элюируется пиком с объемом элюции ~10,5 мл и кажущейся молекулярной массой ~560 кДа (рис. 21А, черная кривая). Исследование образования гетероолигомеров проводили при двух температурах: 4 и 42 °С. Как было показано ранее, при пониженных температурах практически не происходит обмен субъединиц между олигомерами малых белков теплового шока [25], в результате чего профиль элюции смеси HspB1 и HspB6 представляет собой алгебраическую сумму профилей элюции изолированных белков (рис. 21А, синяя кривая). Если на колонку наносили смесь HspB1 и HspB6, предварительно проинкубированную при 42 °С, то на профиле элюции удастся выявить два новых пика с объемами элюции ~12,0 и 13,8 мл и кажущимися молекулярными массами ~300 и ~100 кДа, соответственно (рис. 21А, красная кривая). Эти результаты полностью согласуются с результатами, ранее полученными в нашей лаборатории [25, 65]. По данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН в обоих указанных пиках элюируются гетероолигомерные комплексы HspB1 дикого типа и HspB6 (рис. 21Е). Исследуя образование гетероолигомерных комплексов между HspB6 и мутантными формами HspB1 с заменой G84R (N-концевой домен) и L99M (начало β3-складки α-кристаллинового домена), мы обнаружили, что мутантные формы, также как и белок дикого типа, не образуют гетерокомплексы с HspB6 при 4 °С (рис. 21 Б и В, синий кривые). При этом, при повышенной температуре мутантные формы HspB1 обмениваются субъединицами с HspB6, однако образуют только один тип гетероолигомерных комплексов с кажущейся молекулярной массой ~100 кДа. (рис. 21Б и В,

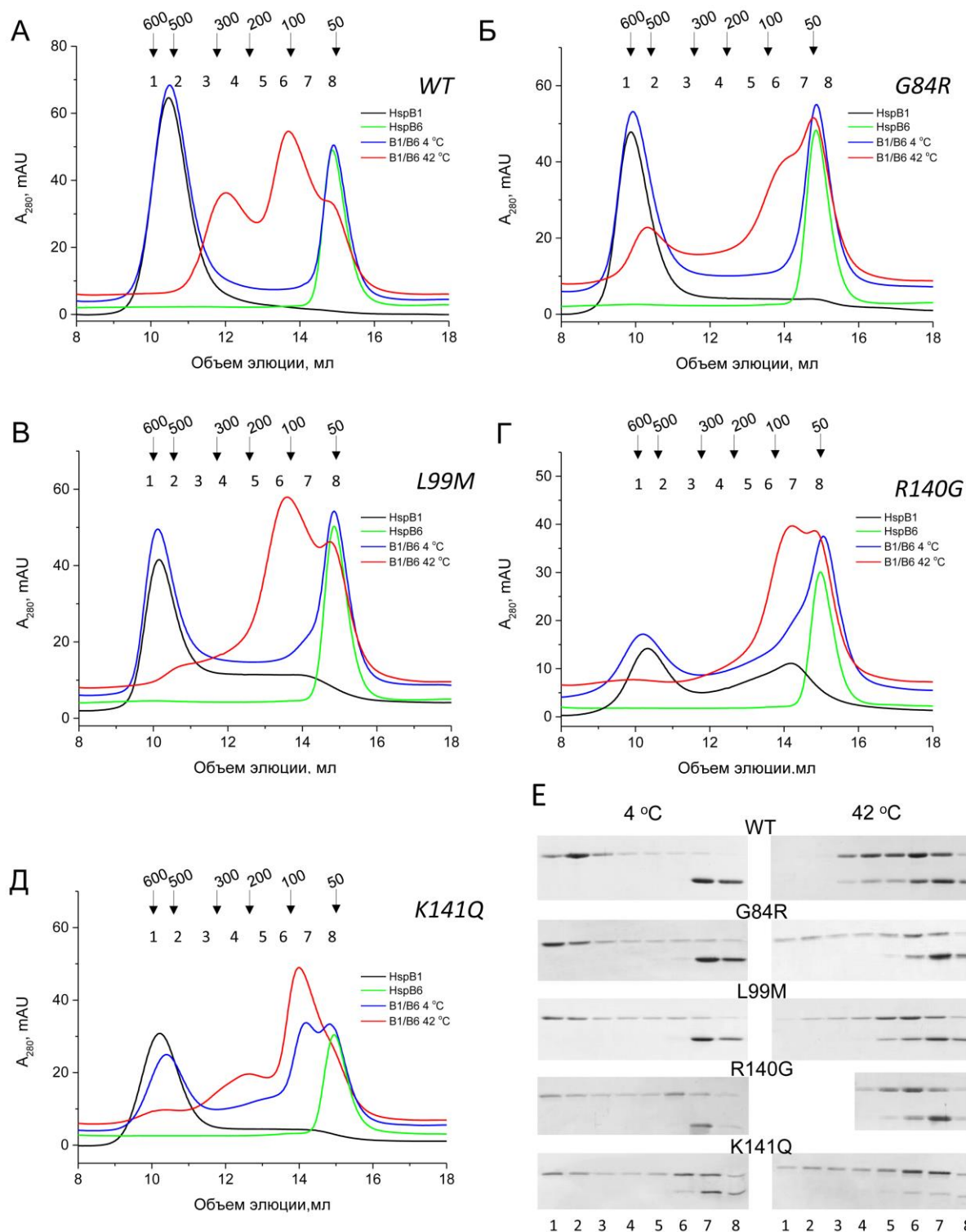


Рис. 21. Образование гетероолигомеров HspB1 и мутантных форм с малым белком теплового шока HspB6. А-Д. Представлены профили элюции изолированных белков и их смесей при гелевой фильтрации на колонке Superdex 200 HR 10/30. Номерами (1-8) обозначены номера фракций, соответствующие номерам дорожек на панели Е. Стрелками над профилями показаны объемы элюции белков с указанными кажущимися молекулярными массами (в кДа). Е. Электрофореграммы фракций после ДСН-электрофореза. Номера дорожек соответствуют номерам фракций (1-8) на панелях А-Д. В1 – HspB1, В6 – HspB6.

красные кривые). При этом вероятность образования гетероолигомерных комплексов HspB1 G84R-HspB6 сравнительно мала и значительное количество мутантной формы HspB1 G84R и HspB6 остаются в виде гомоолигомеров и элюируются в положениях, соответствующих объемам элюции изолированных белков (рис. 21 Б и Е). Вероятность образования гетероолигомера HspB1 L99M-HspB6 была выше, чем в случае мутантной формы G84R, но заметно меньше, чем в случае белка дикого типа (ср. рис. 21 Б и В). HspB1 с точечной заменой K141Q оказался способным образовывать гетероолигомерные комплексы с HspB6 как при низкой, так и при высокой температуре. Однако при этом в обоих случаях образовывались только комплексы с малой молекулярной массой 80-100 кДа (рис. 21Д, синяя и красная линия, соответственно).

Белок HspB1 с заменой R140G образует нестабильные гомоолигомерные комплексы и поэтому представлен в виде двух пиков с объемами элюции 10,3 и 14,2 мл (M_r ~600 и ~80 кДа, соответственно). Диссоциация олигомеров HspB1 R140G приводит к тому, что пик элюции олигомеров малой молекулярной массой частично перекрывается с пиком изолированного HspB6, что несколько усложняет интерпретацию профилей элюции смеси этих белков. При низкой температуре HspB1 с заменой R140G не способен образовывать комплексы с HspB6 (рис. 21Г, синяя кривая). После инкубации белков при повышенной температуре на профиле элюции удастся выявить новый пик с объемом элюции ~14 мл, в котором обнаруживаются оба малых белка теплового шока (рис. 21Г). При этом происходит полное исчезновение пика изолированного HspB1 R140G с объемом элюции 10,3 мл. Таким образом, мутантная форма HspB1 с заменой R140G не способна образовывать крупные гетероолигомерные комплексы с HspB6, но при повышенной температуре образует малые гетероолигомерные комплексы с M_r ~100 кДа. Обнаруженный эффект может быть связан с тем, что объемы элюции малых олигомеров мутантной формы R140G и изолированного HspB6 частично перекрываются. Поэтому представлялось целесообразным использовать дополнительный метод для исследования взаимодействия анализируемых белков.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что формирование гетероолигомеров малых белков теплового шока происходит за счет обмена мономерами [25]. Подобный механизм подразумевает, что гетероолигомер малых белков теплового шока, вероятно, состоит из гетеродимеров, контактирующих β 7-складками. Исследуя структуру и свойства мутантных форм HspB1 различными методами, мы обнаружили, что аминокислотная замена R140G приводит к самым значительным изменениям в структуре белка (табл. 7), именно поэтому для подробного исследования возможности образования гетеродимеров между мутантной формой HspB1 и HspB6 мы выбрали белок с заменой R140G. Для изучения образования гетеродимеров sHsp успешно использовался метод «химического сшивания»

мономеров по остаткам Cys [25]. Как уже отмечалось в обзоре литературы, мономеры в составе димеров малых белков теплового шока взаимодействуют между собой посредством β 7-складки. В этой складке располагаются Cys137 HspB1 и Cys116 в составе так называемого «цистеинового мутанта» HspB6 (рис. 22А). При образовании гомо- или гетеродимера остатки Cys137 двух мономеров малых белков теплового шока оказываются в непосредственной близости, что делает возможным образование дисульфидного мостика, «сшивающего» мономеры в составе гомо- или гетеродимера.

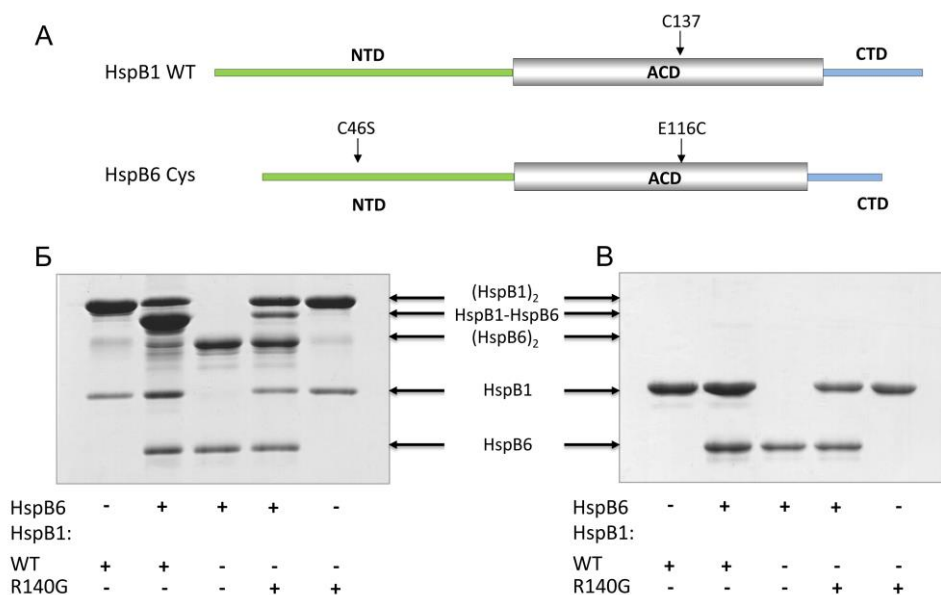


Рис. 22. Образование гетеродимеров HspB1-HspB6, «сшитых» дисульфидной связью, между Cys137 HspB1 и Cys116 «цистеинового мутанта» HspB6. А. Схема расположения остатков цистеина в HspB1 и «цистеиновом мутанте» HspB6. NTD – N-концевой домен; ACD – α -кристаллиновый домен; CTD – С-концевой домен. **Б-В.** Электрофореграммы образцов после диализа против буфера, не содержащего восстановитель. Перед электрофорезом пробы не подвергались (**Б**) или подвергались (**В**) восстановлению избытком меркаптоэтанола. Состав фракций указан под соответствующими дорожками. (HspB1)₂ – димер HspB1; (HspB6Cys)₂ – димер HspB6Cys, HspB1-HspB6 – гетеродимер двух белков.

Как видно на рис. 22Б, HspB1 дикого типа и HspB1 с заменой R140G одинаково эффективно образуют «сшитые» гетеродимеры, что указывает на симметричное расположение Cys137 как в белке дикого типа, так и в мутантной форме белка, т.е. данная замена не влияет на расположение α -кристаллиновых доменов HspB1 в составе димера. Мягкое окисление смеси HspB1 дикого типа и HspB6Cys сопровождается образованием интенсивной зоны, соответствующей «сшитому» дисульфидной связью гетеродимерному комплексу (рис. 22Б, полоса HspB1-HspB6). Эта полоса полностью исчезает при обработке белка избытком меркаптоэтанола (рис. 22В). HspB1 с точечной заменой R140G также способен образовывать гетероолигомеры с «цистеиновым мутантом» HspB6, однако вероятность этого процесса

меньше и интенсивность зоны гетеродимера много меньше соответствующей зоны, образованной HspB1 дикого типа и «цистеиновым мутантом» HspB6 (рис. 22Б, полоса HspB1-HspB6). Таким образом, можно заключить, что белок с точечной заменой R140G способен образовывать малые по размеру гетероолигомеры с HspB6 (скорее всего димеры), однако вероятность образования таких комплексов много меньше, чем в случае белка дикого типа. В связи с тем, что а.к. замена R140G не влияет на способность изолированного HspB1 димеризоваться (рис. 22Б), можно предположить, что в процесс формирования гетеродимеров и гетероолигомеров более высокого порядка вовлечены не только α -кристаллиновые домены, но и другие участки малых белков теплового шока.

На основе представленных результатов, можно заключить, что все исследованные мутантные формы HspB1 способны образовывать гетероолигомерные комплексы с HspB6. Однако эффективность образования гетероолигомерных комплексов, сформированных HspB6 и мутантными формами HspB1, много ниже, чем эффективность образования комплексов между HspB6 и HspB1 дикого типа. Важно отметить, что ни одна из мутантных форм HspB1 не способна образовывать крупные гетероолигомерные комплексы, которые образуются при взаимодействии HspB1 дикого типа с HspB6.

По данным литературы в процессе образования гетероолигомеров значительную роль играют N-концевые домены HspB1 и HspB6. По данным Хербаут и соавт. полноразмерные HspB1 и HspB6 с большей вероятностью образуют гетероолигомеры, чем укороченные белки, состоящие из изолированного α -кристаллинового домена или белки с отсутствующим N-концевым доменом [66]. Картирование участков N-концевого домена HspB1, ответственных за образование гетероолигомеров, выявило, что удаление аминокислотной последовательности ²⁶SRLFD³⁰ (HspB1 Δ 26-30) приводит к образованию гетероолигомеров даже при пониженной температуре, кроме того, белок HspB1 Δ 26-30 образует олигомеры только одного типа (300 кДа), в то время как HspB1 и HspB6 дикого типа образуют два типа гетероолигомеров. Удаление участка ³¹QAFGL³⁵ (HspB1 Δ 31-35), напротив, приводило к образованию только крупных олигомеров с кажущейся молекулярной массой 500 кДа [163]. Данные, представленные Хербаут и соавт., хорошо согласуются с результатами, ранее полученными в нашей лаборатории при исследовании мутантных форм HspB1 с заменами G34R, P39L и E41K, коррелирующими с развитием невропатий (см. табл. 2). Исследованные мутантные формы с заменами в N-концевом домене HspB1 образуют с HspB6 только крупные олигомеры, при этом мутантные формы менее склонны к формированию гетеродимеров с HspB6, чем белок дикого типа [94].

Итак, суммируя все вышесказанное, можно заключить, что в процессе формирования гетероолигомеров малых белков теплового шока HspB1 и HspB6 важную роль играет N-

концевой домен обоих белков [66, 94, 163]. Основываясь на полученных нами результатах и данных литературы, можно предположить, что исследованные аминокислотные замены в α -кристаллиновом домене, вероятно, влияют на положение/подвижность N-концевого домена, что приводит к изменениям в формировании гетероолигомеров с малым белком теплового шока HspB6.

2.3.4. Влияние фосфорилирования на четвертичную структуру HspB1 дикого типа и его мутантных форм

Олигомерное состояние малого белка теплового шока HspB1 может регулироваться различными способами. Данные литературы свидетельствуют о том, что HspB1 может фосфорилироваться как в условиях *in vivo*, так и в условиях *in vitro* несколькими протеинкиназами [60]. При этом MAPKAP киназа 2 (как и большинство других исследованных протеинкиназ) фосфорилирует Ser 15, Ser78 и Ser82, остатки, расположенные в N-концевом домене белка. Фосфорилирование по указанным остаткам сопровождается диссоциацией крупных олигомеров HspB1 и образованием мелких олигомеров, представленных димерами и тетрамерами белка. Исследуемые нами а.к. замены G84R и L99M также расположены в N-концевом домене или на границе N-концевого и кристаллинового доменов. Поэтому представлялось целесообразным исследовать влияние указанных замен на процесс фосфорилирования HspB1 и на то, каким образом фосфорилирование влияет на олигомерную структуру мутантных форм HspB1.

Для того, чтобы следить за процессом фосфорилирования, мы использовали метод электрофореза в системе, предложенной Перрье-Перри [153], в присутствии 8 М мочевины. Фосфорилирование HspB1 сопровождалось появлением зон белка, обладающих большей электрофоретической подвижностью, чем нефосфорилированный белок (рис. 23А) и соответствующих HspB1, фосфорилированному по одному, двум и трем остаткам серина.

Мы исследовали кинетику фосфорилирования белка дикого типа и его мутантных форм с заменами G84R и L99M. Оказалось, что точечные замены G84R и L99M не влияли ни на скорость, ни на степень фосфорилирования HspB1 (рис. 23Б).

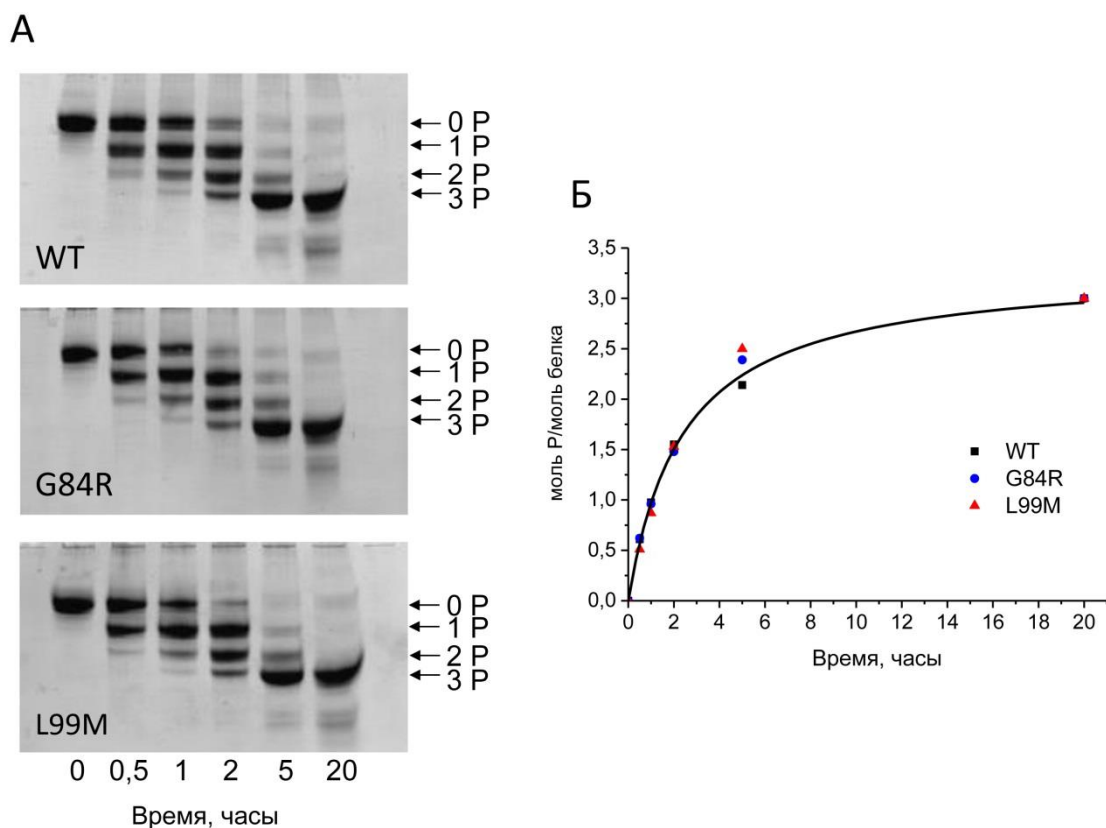


Рис. 23. Фосфорилирование HspB1 дикого типа и мутантных белков с заменами G84R и L99M МАРКАР киназой 2. А. Электрофореграммы, полученные после электрофореза в присутствии мочевины по методу Перрье-Перри. Положения нефосфорилированного, однажды-, дважды- и трижды фосфорилированного белка отмечено стрелками 0P, 1P, 2P и 3P, соответственно. Время инкубации с протеинкиназой указано под каждым треком. Б. Кинетика фосфорилирования HspB1 дикого типа и его мутантных форм.

Как уже отмечалось, фосфорилирование или фосфоимитирующие замены сопровождаются диссоциацией олигомеров HspB1 дикого типа [43]. Используя метод гель-фильтрации, мы исследовали влияние фосфорилирования на олигомерную структуру HspB1 дикого типа и его мутантных форм. На колонку Superdex 200 наносили образцы белка, отличающиеся по степени фосфорилирования (рис. 24). При высокой степени фосфорилирования $\sim 1,5$ моль фосфата на моль белка и белок дикого типа, и его точечные мутантные формы полностью диссоциируют до малых олигомеров (димеров/тетрамеров) (рис. 24А-В, черные и синие кривые). В тоже время при низкой степени фосфорилирования $\sim 0,6$ моль фосфата на моль белка удастся выявить существенные различия. В этих условиях HspB1 дикого типа элюируется в виде широкого пика и представлен олигомерами различного размера с кажущимися молекулярными массами от 100 до 560 кДа. В аналогичных условиях мутантные формы HspB1 с заменами G84R и L99M практически полностью диссоциируют до олигомеров с кажущейся молекулярной массой ~ 100 кДа (рис. 24 А-В, сравнить черные и красные кривые). Таким образом, замены G84R и L99M

способствуют вызванной фосфорилированием киназой MARKAP2 диссоциации крупных олигомеров HspB1. Полученные данные хорошо согласуются с результатами, полученными при изучении четвертичной структуры гомоолигомеров мутантных белков G84R и L99M (рис. 17). Действительно, как отмечалось ранее, олигомеры, образуемые мутантными белками HspB1 G84R и HspB1 L99M менее стабильны, чем олигомеры, образованные белком дикого типа.

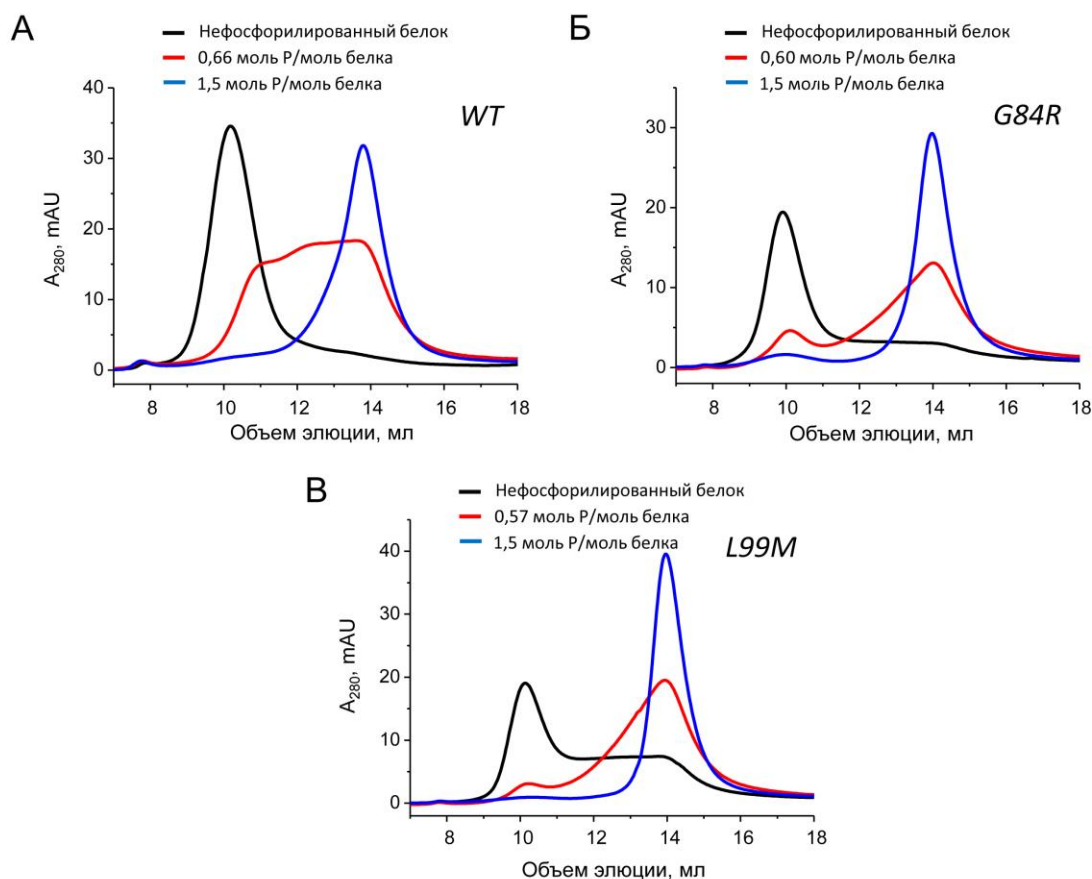


Рис. 24. Гель-фильтрация в различной степени фосфорилированного HspB1 дикого типа и HspB1 с точечными заменами G84R и L99M. А-В. Профили элюции препаратов нефосфорилированного и в различной степени фосфорилированного HspB1 на колонке Superdex 200 HR 10/30.

2.4. Сравнение шапероноподобной активности HspB1 дикого типа и его мутантных форм

Шапероноподобная активность является одним из важнейших свойств малых белков теплового шока. Под шапероноподобной активностью понимают способность малых белков теплового шока предотвращать агрегацию белков-субстратов. При этом всегда возникает вопрос о том, какие белки можно использовать в качестве модельных субстратов и насколько сделанный выбор отражает реальную функциональную активность малых белков теплового шока. В нашей работе мы использовали четыре модельных субстрата: лизоцим (Л-м), α -лактальбумин (а-лак), субфрагмент-1 миозина (S1) и лизат клеток линии НЕК293F (рис. 25).

α -лактальбумин содержит 4 дисульфидные связи, восстановление которых приводит к денатурации и агрегации белка, которая сопровождается значительным увеличением оптической плотности при 340 нм (рис. 25А, кривая а-lac). При длительном времени инкубации мелкие агрегаты слипаются между собой и выпадают в осадок, что сопровождается постепенным уменьшением оптической плотности пробы (рис. 25А, кривая а-лак). Все исследуемые малые белки теплового шока за исключением мутантной формы R140G, эффективно предотвращали агрегацию денатурированного α -лактальбумина (рис. 25А). HspB1 с заменой R140G замедлял, но не был способен предотвратить агрегацию восстановленного α -лактальбумина (кривая R140G, рис. 25А). Проанализировав состав растворимой и нерастворимой фракции по окончании агрегации, мы обнаружили, что белок HspB1 R140G обнаруживается в осадке денатурированного α -лактальбумина (рис. 25Б, дорожка 3). Представленные данные свидетельствуют о том, что, хотя мутантная форма и связывается с субстратом, она не способна предотвратить его агрегацию.

Восстановление дисульфидных связей в лизоциме приводит к агрегации белка, сопровождающейся увеличением оптической плотности при 340 нм (кривая Л-м, рис. 25В). В выбранных условиях малый белок теплового шока HspB1 дикого типа задерживал начало процесса агрегации восстановленного лизоцима, но был не способен полностью предотвратить её (кривая WT на панелях А и В рис. 25В). Важно отметить, что в ходе длительной инкубации происходило значительное увеличение оптической плотности при 340 нм. Аналогичное явление ранее было описано в литературе [164]. Авторы связывают данный эффект с тем, что на ранних этапах агрегации HspB1, проявляя шапероноподобную активность, связывается с денатурированным лизоцимом и препятствует его агрегации. Однако, впоследствии шаперон выступает в качестве своеобразного мостика и связывает между собой агрегаты денатурированного лизоцима, что

сопровождается образованием крупных частиц, состоящих из шаперона и белка-субстрата, которые обладают значительной светорассеивающей способностью. Все исследуемые мутантные формы (за исключением K141Q) менее эффективно, чем белок дикого типа удлиняли лаг-период, т.е. время от момента добавления восстановителя до начала агрегации лизоцима. Представленные результаты свидетельствуют о том, что точечные замены G84R, L99M и R140G приводят к уменьшению шапероноподобной активности HspB1, измеренной с использованием лизоцима в качестве модельного субстрата.

В вышеописанных экспериментах по измерению шапероноподобной активности агрегацию субстратов вызывали восстановлением дисульфидных связей. Для того, чтобы сравнить шапероноподобную активность HspB1 дикого типа и его мутантных форм с точечными аминокислотными заменами в условиях термической агрегации, в качестве субстрата был выбран субфрагмент-1 миозина (S1). При нагревании S1 происходит его термическая денатурация, сопровождающаяся агрегацией и увеличением оптической плотности при 340 нм (рис. 25Г, кривая S1). При длительной инкубации происходит дальнейшая агрегация денатурированного белка и его выпадение в осадок, вследствие чего оптическая плотность при 340 нм уменьшается. Добавление HspB1 дикого типа и его мутантных форм с заменами G84R, L99M и K141Q значительно замедляет процесс термоагрегации S1 (рис. 25Г). Белок с заменой R140G обладает минимальной шапероноподобной активностью, и в ходе длительной инкубации даже способствует агрегации денатурированного S1 (рис. 25Г, кривая R140G). Таким образом, с использованием модельных белков-субстратов было показано, что среди всех исследуемых мутантных форм наименьшей шапероноподобной активностью обладал белок с точечной заменой R140G. Остальные мутантные формы (G84R, L99M и K141Q) обладали либо сравнимой, либо немного меньшей по сравнению с белком дикого типа шапероноподобной активностью.

Несмотря на повсеместное использование изолированных белков в качестве модельных субстратов для измерения шапероноподобной активности, такой подход имеет ряд недостатков. Например, из-за определенной субстратной специфичности и различных способов индуцирования агрегации, использование разных белков-субстратов для измерения шапероноподобной активности одного и того же sHsp, может давать различные, зачастую противоположные результаты [163]. В связи с этим в последнее время в литературе появились работы, в которых в качестве субстрата для изучения шапероноподобной активности малых белков теплового шока используют нефракционированную смесь белков клеточного лизата [15, 43]. Мы получили лизат клеточной линии HEK293F, которая не содержит эндогенного HspB1 и проводили термическую обработку полученного гомогената

при 55 °C в течение 1,5 часов (рис. 25 Д и Е). После окончания инкубации, проводимой в присутствии или в отсутствие добавленного HspB1, образцы центрифугировали и определяли количество белка, оставшегося в супернатанте (рис. 25Д). В качестве контроля использовали лизат клеток, инкубированный такое же время при 4 °C. Как видно на рис. 25Д, нагревание сопровождается двукратным уменьшением количества растворимого белка, при этом как добавление HspB1 дикого типа, так и мутантных форм R140G и K141Q в равной степени увеличивало количество белка, остающегося в супернатанте. По-видимому, использование смеси клеточных белков в качестве модельного субстрата нивелирует эффект субстратной специфичности, чем и объясняется сопоставимая с белком дикого типа шапероноподобная активность анализируемых мутантных форм HspB1. Другое объяснение полученных результатов может состоять в том, что в клетках HEK293F, не экспрессирующих HspB1, имеются какие-то иные, не зависящие от малых белков теплового шока механизмы, обеспечивающие защиту клетки от накопления денатурированных белков. В этом случае добавление как белка дикого типа, так и его мутантных форм к лизату таких клеток может сопровождаться приблизительно одинаковым эффектом.

Проведя исследование физико-химических свойств мутантных форм HspB1 и выявив определенные изменения в структуре и свойствах этих белков, мы задались вопросом, каким образом экспрессия этих мутантных форм может приводить к развитию различных форм нейродегенеративных заболеваний. В обзоре литературы мы уже отмечали, что зачастую повреждение и гибель нейронов может быть связана с нарушениями в функционировании цитоскелета. Одним из важных компонентов цитоскелета является система промежуточных филаментов. До последнего времени в литературе отсутствовали сведения о взаимодействии малых белков теплового шока с промежуточными филаментами нервных клеток. По этой причине представлялось целесообразным провести подробное изучение влияния различных малых белков теплового шока на процессы полимеризации нейрофиламентов, промежуточных филаментов нервных клеток.

3. Взаимодействие малых белков теплового шока с белком легкой цепи нейрофиламентов

3.1. Выделение и очистка белка легкой цепи нейрофиламентов (NFL)

Экспрессию NFL проводили в клетках E.coli штамма BL21(DE3)pLysS, трансформированных плазмидой pET30a, содержащей кодирующую последовательность белка легкой цепи нейрофиламентов быка. Экспрессию индуцировали либо добавлением IPTG, либо методом автоиндукции. Белок легкой цепи нейрофиламентов относится к семейству белков промежуточных филаментов, образующих очень стабильные фибриллы

(филаменты). Экспрессия таких белков в бактериальных системах сопровождается накоплением нерастворимых белков в тельцах включения [165] (рис. 26А). Тельца включения промывали несколько раз лизис-буфером, а также буферными растворами, содержащими различные количества Triton X-100 и NaCl. После последней отмывки тельца включения растворяли в буфере, содержащем 8 М мочевины, и приступали к очистке целевого белка методами ионообменной хроматографии. При выделении с 0,5 л бактериальной культуры мочевиный экстракт наносили на 5 мл колонку HiTrap Q двумя-тремя порциями. На рис. 26Б представлен профиль элюции белков на HiTrap Q. Белок легкой цепи нейрофиламентов элюировался при достижении концентраций NaCl 0,35 М, при этом большая часть примесных белков остается во фракциях, не сорбирующихся на колонке или элюировавшихся в самом начале градиента NaCl (рис. 26В, дорожки 18 и 55). Дальнейшую очистку NFL проводили на 5 мл колонке HiTrap SP (рис. 26Г). Белок легкой цепи нейрофиламентов элюировался в конце градиента NaCl. С использованием катионообменника на последней стадии удалось очистить NFL от примесных низкомолекулярных белков (рис. 26Г врезка). Фракции, обогащенные очищенным белком NFL (рис. 26Г, врезка, дорожки 100-103), объединяли, концентрировали, доводили pH до 8 и хранили при -80 °C в буферном растворе, содержащем 8 М мочевины. Выход белка с 1 л бактериальной культуры составлял 10 (индукция IPTG) - 40 (автоиндукция) мг. По данным электрофореза в присутствии ДСН чистота препаратов белка NFL была не менее 92%.

3.2. Получение филаментов NFL in vitro

Для изучения взаимодействия NFL с малыми белками теплового шока необходимо получение филаментов NFL. Индукция полимеризации NFL in vitro осуществляется добавлением NaCl. По данным литературы для реконструирования промежуточных филаментов in vitro используется несколько подходов, среди которых наиболее распространенным является диализ раствора белка промежуточных филаментов против буфера, содержащего NaCl (рис. 9А). Морфологию полученных указанным способом филаментов анализировали с помощью электронной микроскопии (рис. 26Д). При описанном способе полимеризации NFL образуют короткие филаменты длиной 100-200 нм и диаметром 10-14 нм, что нехарактерно для промежуточных филаментов, образованных десмином [80] и другими белками промежуточных филаментов, но полностью согласуется со структурой филаментов, образованных легкой цепью нейрофиламентов [166]. Эти короткие филаменты полностью осаждаются при ультрацентрифугировании (1 час при 105000 g) (рис. 26Д, врезка), что также согласуется с данными литературы.

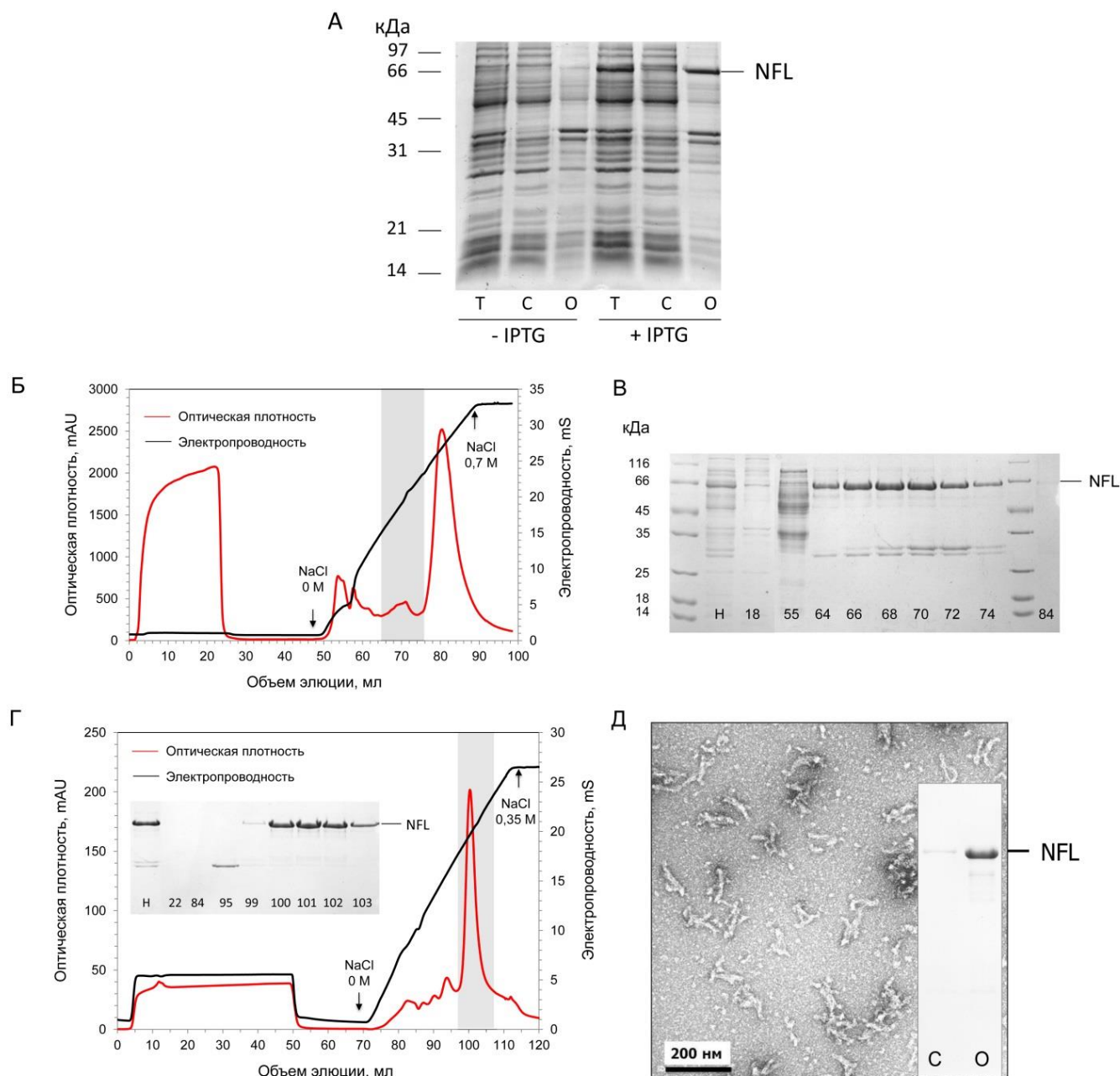


Рис. 26. Выделение белка легкой цепи нейрофиламентов (NFL) и получение филаментов NFL. **А.** Экспрессия белка легкой цепи нейрофиламентов в клетках *E.coli* BL21(DE3)pLysS. -IPTG – белковый состав проб до индукции синтеза; +IPTG – белковый состав проб после индукции синтеза, Т – клеточный лизат, С – фракция растворимых белков; О – фракция нерастворимых белков. **Б.** Профиль элюции белков при ионообменной хроматографии на колонке HiTrapQ. Стрелками обозначены начало и конец градиента NaCl. Положение фракций, обогащенных NFL, отмечено серым цветом. **В.** Электрофореграмма фракций после ионообменной хроматографии. Номера дорожек соответствуют объему элюции фракций на профиле, представленном на панели Б. Н – наносимый препарат. **Г.** Профиль элюции белков при ионообменной хроматографии на колонке HiTrapSP. Стрелками обозначены начало и конец градиента NaCl. Положение фракций, обогащенных белком NFL, отмечено серым цветом. Во врезке представлена электрофореграмма фракций после хроматографии. Номера дорожек соответствуют объему элюции фракций на профиле, представленном на панели Г. Н – наносимый препарат. **Д.** Филаменты NFL, полученные методом диализа белка против буфера, содержащего 190 мМ NaCl (схема получения филаментов представлена рис. 8А). Электронная микрофотография, полученная при негативном контрастировании филаментов раствором уранилацетата. Во врезке представлена электрофореграмма супернатанта (С) и осадка (О), полученных после ультрацентрифугирования (105000 g 1 час) препарата филаментов NFL.

3.3. Влияние малых белков теплового шока на полимеризацию NFL

Метод дифференциального центрифугирования давно и успешно используется для изучения взаимодействия белков-партнеров с промежуточными филаментами [165]. Как уже отмечалось филаменты NFL осаждаются при высокоскоростном центрифугировании при 105000 g (рис. 26Д). Однако находящиеся в растворе филаменты могут взаимодействовать между собой, образуя пучки, которые осаждаются при низкоскоростном центрифугировании (менее 20000 g). Поэтому представлялось целесообразным исследовать влияние HspB1 как на поведение изолированных филаментов, так и на склонность филаментов образовывать пучки. При низкоскоростном центрифугировании мы могли отделить пучки от изолированных филаментов и определить влияние HspB1 на распределение NFL между этими фракциями. Для изучения влияния малого белка теплового шока HspB1 на образование пучков NFL образцы, содержащие изолированный NFL или NFL в присутствии HspB1, диализовали против буфера полимеризации (см. схему эксперимента на рис. 9А), после чего проводили низкоскоростное центрифугирование. По данным литературы, ренатурированный после обработки 8М мочевиной HspB1 по своим свойствам не отличается от необработанного белка [101]. Как видно на рис. 27А, при высоких концентрациях белка около 30% изолированного NFL образовывало пучки филаментов и осаждалось при низкоскоростном центрифугировании (рис. 27А, последняя дорожка). В этих условиях малый белок теплового шока препятствовал образованию пучков филаментов (рис. 26Б б), последняя дорожка). Супернатант, полученный после низкоскоростного центрифугирования подвергали высокоскоростному центрифугированию, в ходе которого в зависимости от общей концентрации белка, в супернатанте оставалось около 20-30% изолированного NFL (рис. 27В и Г). Если полимеризацию NFL проводили в присутствии HspB1, то количество NFL, остающегося в супернатанте после высокоскоростного центрифугирования значительно возрастало (рис. 27В и Г). Представленные данные свидетельствуют о том, что малый белок теплового шока может предотвращать «пучкование» филаментов и каким-то образом ингибирует образование одиночных филаментов NFL или влияет на их гидродинамические свойства, препятствуя осаждению при ультрацентрифугировании.

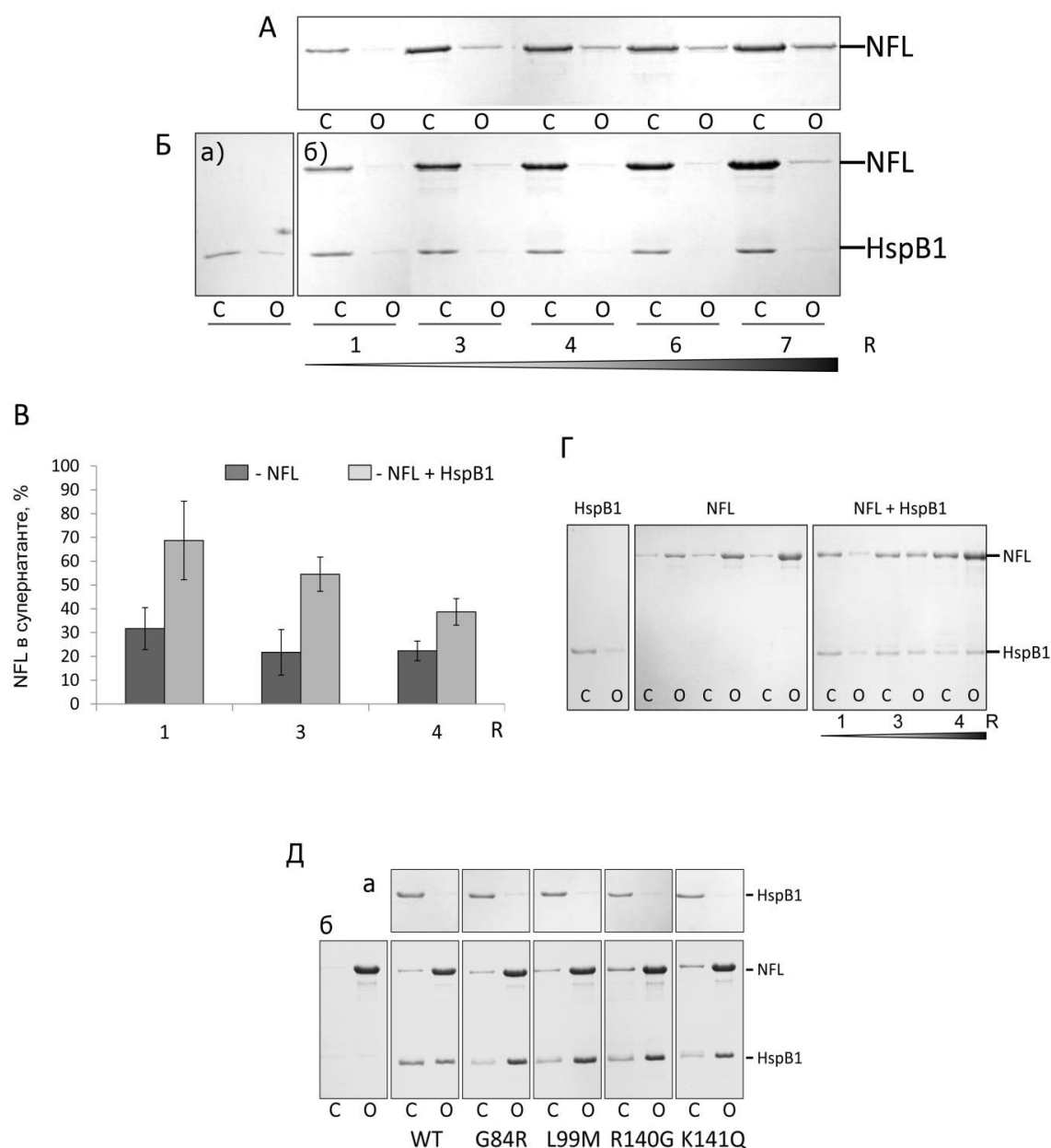


Рис. 27. Влияние малого белка теплового шока HspB1 на осаждение филаментов NFL. А-Б. Распределение исследуемых белков между супернатантом (С) и осадком (О) после низкоскоростного центрифугирования при 10000 g изолированных филаментов (А), изолированного HspB1 (Б,а) и смеси NFL и HspB1 (Б,б). В. Доля NFL в супернатанте после высокоскоростного центрифугирования (105000 g) в пробах, не содержащих HspB1 (NFL), и в пробах, содержащих HspB1 (NFL+HspB1). Представлены результаты (среднее $\pm$ стандартное отклонение) по результатам семи независимых экспериментов. Г. Электрофореграмма проб после высокоскоростного центрифугирования изолированного HspB1 (2 μ M) изолированных NFL (2, 6, 8 μ M) и смеси 2 μ M HspB1 и 2, 6, 8 μ M NFL. Филаменты NFL были получены в присутствии HspB1 (рис. 9В). R – молярное соотношение NFL к HspB1 в расчете на мономер. Д. Взаимодействие белка легкой цепи нейрофиламентов с мутантными формами HspB1. Представлена электрофореграмма образцов, полученных после высокоскоростного центрифугирования (105000g) изолированных (а) HspB1 дикого типа (WT), его мутантных форм, а также смеси (б) нейрофиламентов с HspB1 дикого типа и его мутантными формами. Молярное отношение NFL/sHsp 1/1 (по 11 μ M). С – супернатанты, О – осадки.

При изучении взаимодействия мутантных форм HspB1 с белком легкой цепи нейрофиламентов мы использовали различные экспериментальные подходы, в том числе смешивали NFL с HspB1 WT и его мутантными формами и после смешивания инициировали процесс полимеризации нейрофиламентов повышением ионной силы (рис. 9). Оказалось, что HspB1 и исследуемые мутантные формы (G84R, L99M, R140G и K141Q) ингибировали процесс полимеризации (рис. 27Д) и увеличивали количество NFL, остающихся в супернатанте после ультрацентрифугирования (рис. 27Д). Хотя количество NFL, остающегося в супернатанте в присутствии HspB1 дикого типа и его мутантных форм, было сравнимым, оказалось, что количество мутантных форм белка, детектируемое в осадке филаментов, было больше, чем количество белка дикого типа (рис. 27Д). Эти результаты могут свидетельствовать о том, что мутированные формы HspB1 либо прочнее связываются, либо имеют дополнительные участки связывания на NFL.

В отдельном эксперименте мы попытались с помощью электронной микроскопии исследовать структуру изолированного HspB1, изолированных филаментов NFL и филаментов NFL, полученных в присутствии HspB1 (рис. 28). Изолированный HspB1 представлен в виде сферических частиц с диаметром 14-18 нм (рис. 28А) [16]. Изолированный NFL образует короткие гибкие филаменты (рис. 28Б). Если NFL полимеризовался в присутствии HspB1, то сферические частицы, образованные HspB1, очень часто оказывались расположенными вблизи или на поверхности филаментов (рис. 28В). Вероятно, связывание HspB1 может влиять на гидродинамические свойства филаментов NFL и их осаждение при ультрацентрифугировании. Это предположение, несомненно, нуждается в дополнительной экспериментальной проверке.

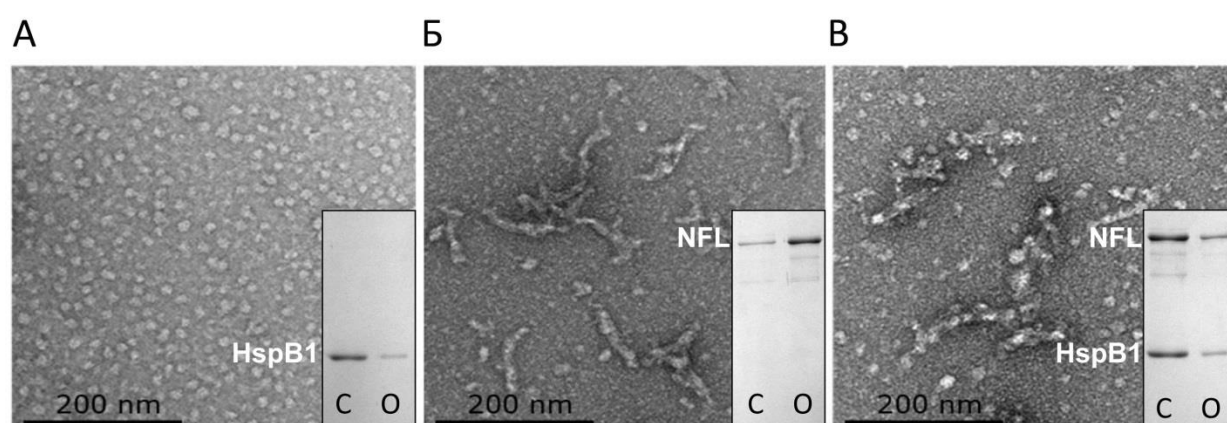


Рис. 28. Электронная микрофотография изолированного HspB1 (А), изолированных NFL (Б), и смеси NFL и HspB1 (В). Концентрация HspB1 и NFL составляла 11 μ M. На сетки наносили образцы NFL и HspB1 до центрифугирования. Во врезках представлены результаты электрофореза по методу Леммли супернатантов (С) и осадков (О) соответствующих образцов, полученных после высокоскоростного центрифугирования при 105000 g.

3.4. Определение стехиометрии связывания HspB1 с филаментами, образованными белком легкой цепи нейрофиламентов

Для определения стехиометрии связывания полимеризованные филаменты NFL титровали HspB1 (схема, рис. 9В). Полученные комплексы центрифугировали при 105000 g и определяли количество связавшегося с филаментами HspB1 (рис. 29). Было установлено, что при насыщении 1 моль мономеров HspB1 приходится на 2 моля мономера NFL. Минимальной структурной единицей промежуточных филаментов является димер, а олигомер HspB1 состоит из ~24 субъединиц. Поэтому полученные нами результаты означают, что на 24 димера NFL приходится один олигомер HspB1.

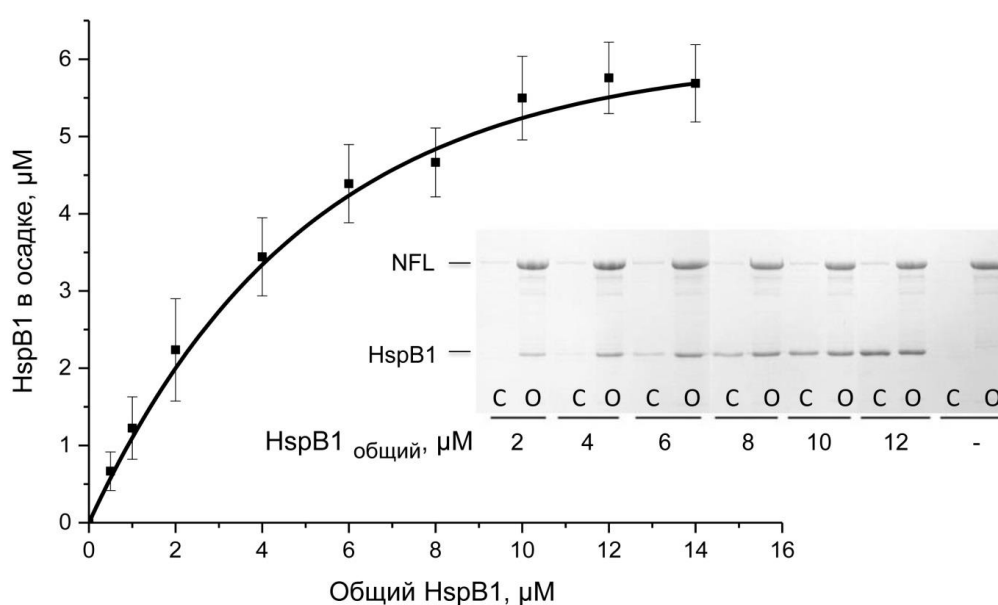


Рис. 29. Титрование преобразованных филаментов NFL малым белком теплового шока HspB1 дикого типа. Во врезке представлена типовая электрофореграмма после электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН супернатанта (C) и осадка (O) после высокоскоростного центрифугирования при 105000 g. Представлены результаты (среднее $\pm$ стандартное отклонение) анализа проб по результатам четырех независимых экспериментов.

3.5. Фосфорилирование тетрамеров и филаментов NFL цАМФ-зависимой протеинкиназой

Промежуточные филаменты являются динамичными структурами, способными к регулируемой сборке и разборке. Регуляция сборки/разборки нейрофиламентов может осуществляться путем фосфорилирования их N-концевых и С-концевых доменов. При этом считается, что фосфорилирование С-концевых доменов средней (NFM) и тяжелой (NFH) цепей нейрофиламентов отвечает за латеральные взаимодействия тяжёлых филаментов. В тоже время известно, что фосфорилирование N-концевого домена белка легкой цепи нейрофиламентов цАМФ-зависимой протеинкиназой (ПКА) препятствует образованию филаментов [141, 143]. В связи с тем, что добавление малого белка теплового шока HspB1 препятствует полимеризации NFL, мы предположили, что участки связывания HspB1 могут располагаться в N-концевом домене NFL. Если это предположение справедливо, то можно было ожидать, что добавление HspB1 каким-то образом повлияет на фосфорилирование N-концевого домена NFL под действием цАМФ-зависимой протеинкиназы. Для проверки данного предположения было проведено фосфорилирование белка легкой цепи нейрофиламентов цАМФ-зависимой протеинкиназой *in vitro* (рис. 30). В этих экспериментах мы использовали как заранее полимеризованные филаменты NFL, так и тетрамеры NFL, которые представляют собой структуры, формирующиеся на начальных этапах сборки филаментов. Для получения тетрамеров раствор NFL в мочеvine диализовали против буфера с низкой ионной силой и щелочным значением pH (см. схему на рис. 9Б)

Фосфорилирование тетрамеров NFL сопровождалось включением радиоактивной метки в состав белка (рис. 30Б и В), в то время как филаменты NFL практически не фосфорилировались ПКА. Эти результаты хорошо согласуются с данными литературы [141]. Добавление малого белка теплового шока HspB1 никак не влияло ни на эффективность фосфорилирования тетрамеров NFL, ни на эффективность фосфорилирования филаментов NFL. Представленные данные могут означать, что участки связывания HspB1 находятся вне N-концевого домена (или удалены от участков фосфорилирования). По последним данным за взаимодействие десмина с α B-кристаллином (другим малым белком теплового шока) отвечает участок, ограниченный остатками 452-470 в С-концевом домене десмина, и в частности остаток аргинина R454 [167]. Первичные структуры десмина и белка легкой цепи нейрофиламентов высоко гомологичны в N-концевом и центральном (rod) доменах, в то время как С-концевой домен этих белков значительно отличается (рис. 30Г). Тем не менее, есть основания полагать, что за взаимодействие HspB1 с белком легкой цепи нейрофиламентов также может отвечать С-концевой домен, так как именно этот домен NFL,

наравне с С-концевыми доменами NFM и NFH, находится на поверхности зрелого филамента [168].

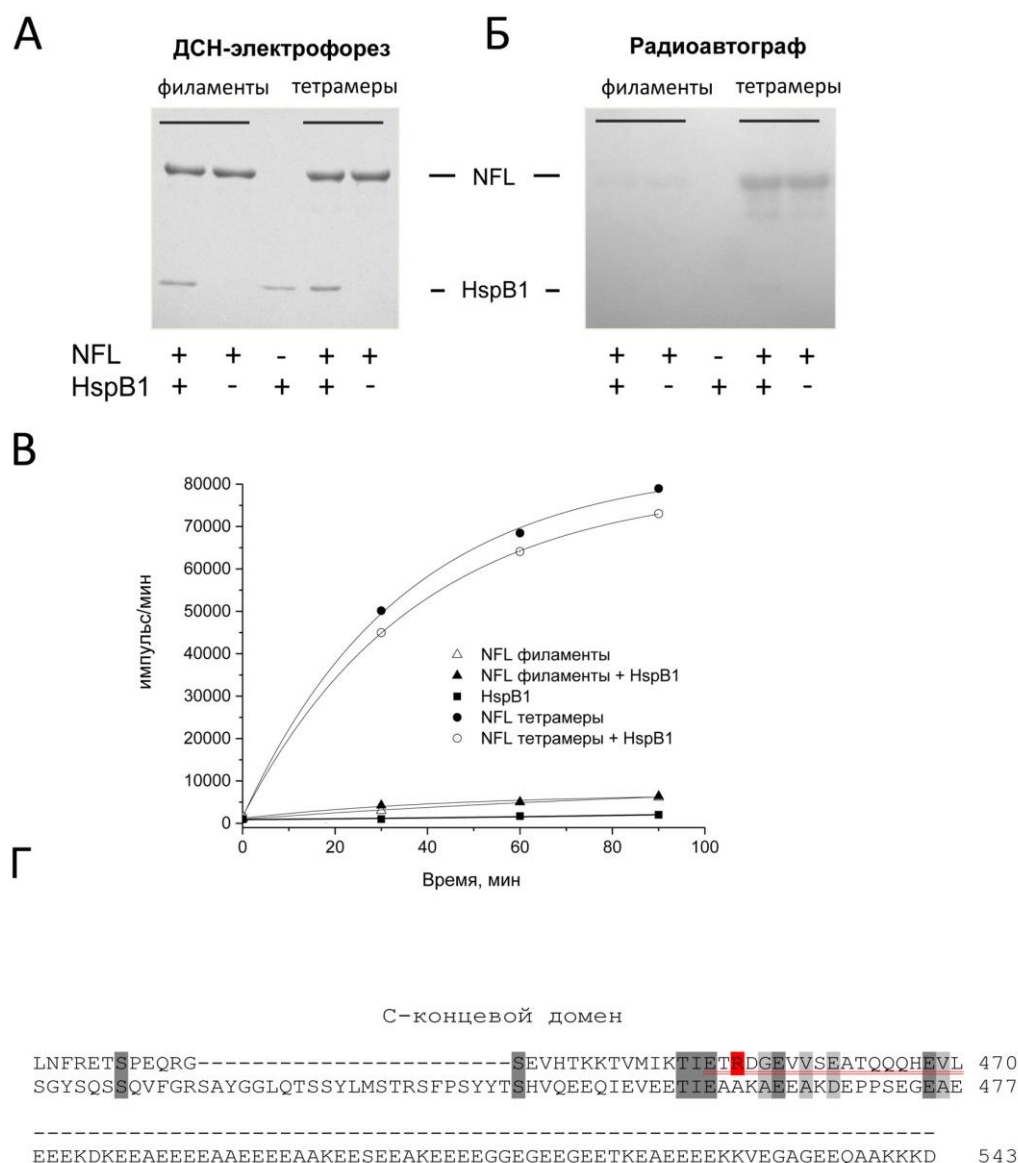


Рис. 30. Фосфорилирование NFL каталитической субъединицей цАМФ-зависимой протеинкиназы. **А.** Электрофореграмма образцов после фосфорилирования преобразованных филаментов и тетрамеров NFL под действием каталитической субъединицы цАМФ-зависимой протеинкиназы в присутствии γ - P^{32} -АТФ. Состав проб указан под электрофореграммами. **Б.** Радиоавтограф геля, представленного на панели А. **В.** Кинетика фосфорилирования филаментов и тетрамеров NFL. Во всех опытах молярное отношение мономер NFL/мономер HspB1 составляло 5. **Г.** Выравнивание аминокислотных последовательностей С-концевых доменов десмина и белка легкой цепи нейрофиламентов. Насыщенность серого цвета обозначает консервативность аминокислотного остатка. Красным цветом обозначен остаток аргинина R454.

Другой причиной отсутствия влияния HspB1 на фосфорилирование тетрамеров NFL может быть неспособность малого белка теплового шока взаимодействовать с олигомерами, образующимися на ранних стадиях полимеризации нейрофиламентов. Для проверки этого предположения, мы использовали метод аналитического ультрацентрифугирования.

3.6. Использование метода аналитического ультрацентрифугирования для анализа взаимодействия малых белков теплового шока с NFL

Процесс полимеризации промежуточных филаментов от димеров до зрелых филаментов проходит, по-видимому, в три стадии: очень быстрое образование тетрамеров, сборка ULF-частицы (unit length filaments), переупаковка субъединиц в составе ULF и удлинение филамента [169]. Можно предположить, что малые белки теплового шока могут влиять на разные стадии процесса полимеризации NFL. В этой связи представлялось целесообразным исследовать взаимодействие HspB1 как с тетрамерами, так и с полностью сформированными филаментами NFL. Используя метод аналитического ультрацентрифугирования, мы определили коэффициент седиментации тетрамеров NFL, который составил 7 s. В указанных условиях (т.е. при низкой ионной силе, в условиях, при которых могут существовать тетрамеры NFL) коэффициент седиментации HspB1 оказался равным ~ 10 s, что согласуется с данными литературы [170] (рис. 31А, черная и синяя кривые). Анализ седиментограмм образца, содержащего смесь тетрамеров NFL и HspB1, не выявил дополнительных пиков седиментации (рис. 30А, красная кривая). Полученные данные указывают на то, что малый белок теплового шока HspB1 не взаимодействует с тетрамерами NFL. Вероятно, именно по этой причине мы не смогли выявить никакого влияния HspB1 на фосфорилирование тетрамеров NFL (см. рис. 30).

Полностью полимеризованные филаменты NFL седиментируются в виде широкого гетерогенного пика с коэффициентом седиментации, превышающим 120 s (данные не представлены). В условиях существования полностью полимеризованных филаментов (т.е. при достаточно высокой ионной силе, равной 190 mM NaCl) изолированный HspB1 седиментируется в виде узкого пика с коэффициентом седиментации около 17 S. Если полимеризацию NFL проводили в присутствии HspB1, то на седиментограмме удастся выявить довольно широкий пик с коэффициентом седиментации в диапазон 60-90 s (рис. 31Б). Эти результаты свидетельствуют о том, что HspB1 не способен взаимодействовать с тетрамерами, но влияет на последующие стадии сборки промежуточных филаментов, например, взаимодействует с ULF или каким-то образом влияет на гидродинамические свойства сформировавшихся в его присутствии зрелых филаментов NFL.

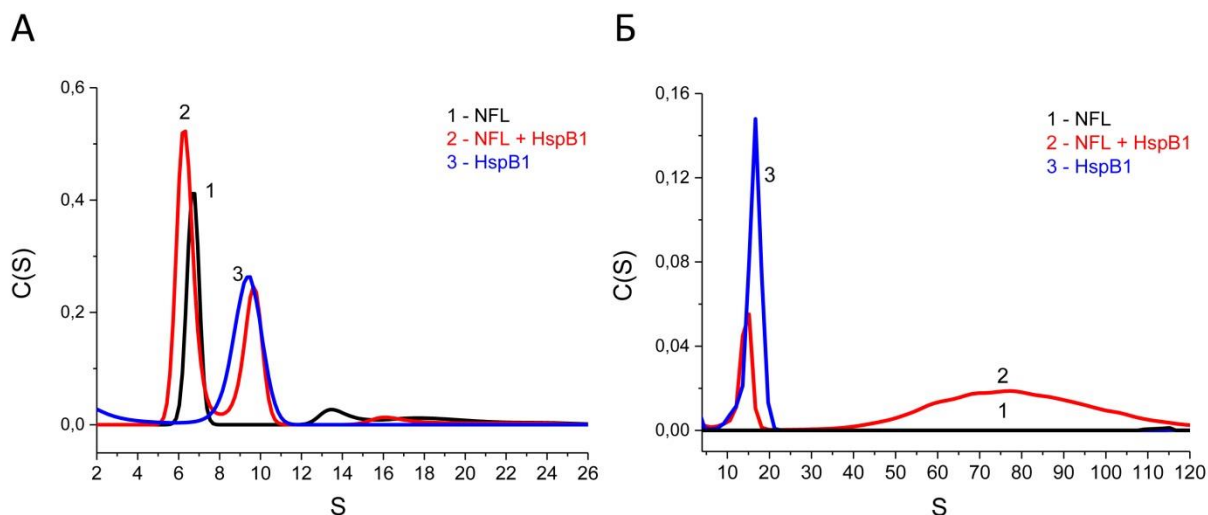


Рис. 31. Исследование взаимодействия NFL и HspB1 методом аналитического ультрацентрифугирования. А. Седиментограмма изолированного HspB1, изолированных тетрамеров NFL и их смеси при низкой ионной силе предотвращающей формирование филаментов. Б. Седиментограмма изолированного HspB1, изолированных филаментов и их смеси при высокой ионной силе, обеспечивающей формирование филаментов. Полимеризацию филаментов проводили в присутствии HspB1, молярное соотношение NFL/HspB1 равно 1.

3.7. Изучение полимеризации с использованием NFL, модифицированного по единственному остатку цистеина пиренилмалеимидом (PM)

В литературе описаны методы изучения полимеризации различных промежуточных филаментов, модифицированных флуоресцентными метками [81, 171]. Тем не менее, применимо к белкам нейрофиламентов, ранее данный подход не использовался. Для модификации белка NFL по единственному остатку цистеина (Cys322) мы использовали флуоресцентную метку пиренилмалеимид (рис. 32А). В выбранных условиях степень модификации белка, измеренная спектрофотометрически, составляла 0,8-1,2 моль флуоресцентной метки на моль NFL, что свидетельствует в пользу специфической модификации единственного остатка цистеина. Полимеризацию PM-NFL начинали со стабильного промежуточного продукта полимеризации – тетрамеров NFL, получаемых с помощью диализа против буфера, не содержащего соль (рис. 9Б). На рис. 31Б представлен спектр флуоресценции модифицированного PM-NFL (черная кривая). Спектр флуоресценции модифицированного NFL имеет характерную форму: 2 выраженных максимума флуоресценции мономеров пирена (385 нм и 400 нм) и плечо при 470 нм, соответствующее флуоресценции эксимеров пирена. Полимеризацию PM-NFL индуцировали добавлением NaCl до конечной концентрации 190 мМ. Полимеризация сопровождается одновременным увеличением флуоресценции мономеров пиренилмалеимида и уменьшением флуоресценции эксимеров (рис. 32Б, красная кривая). По окончании полимеризации образцы

ультрацентрифугировали при 105000 g, подтверждая, что полученные филаменты осаждаются так же, как и при использовании других способов полимеризации.

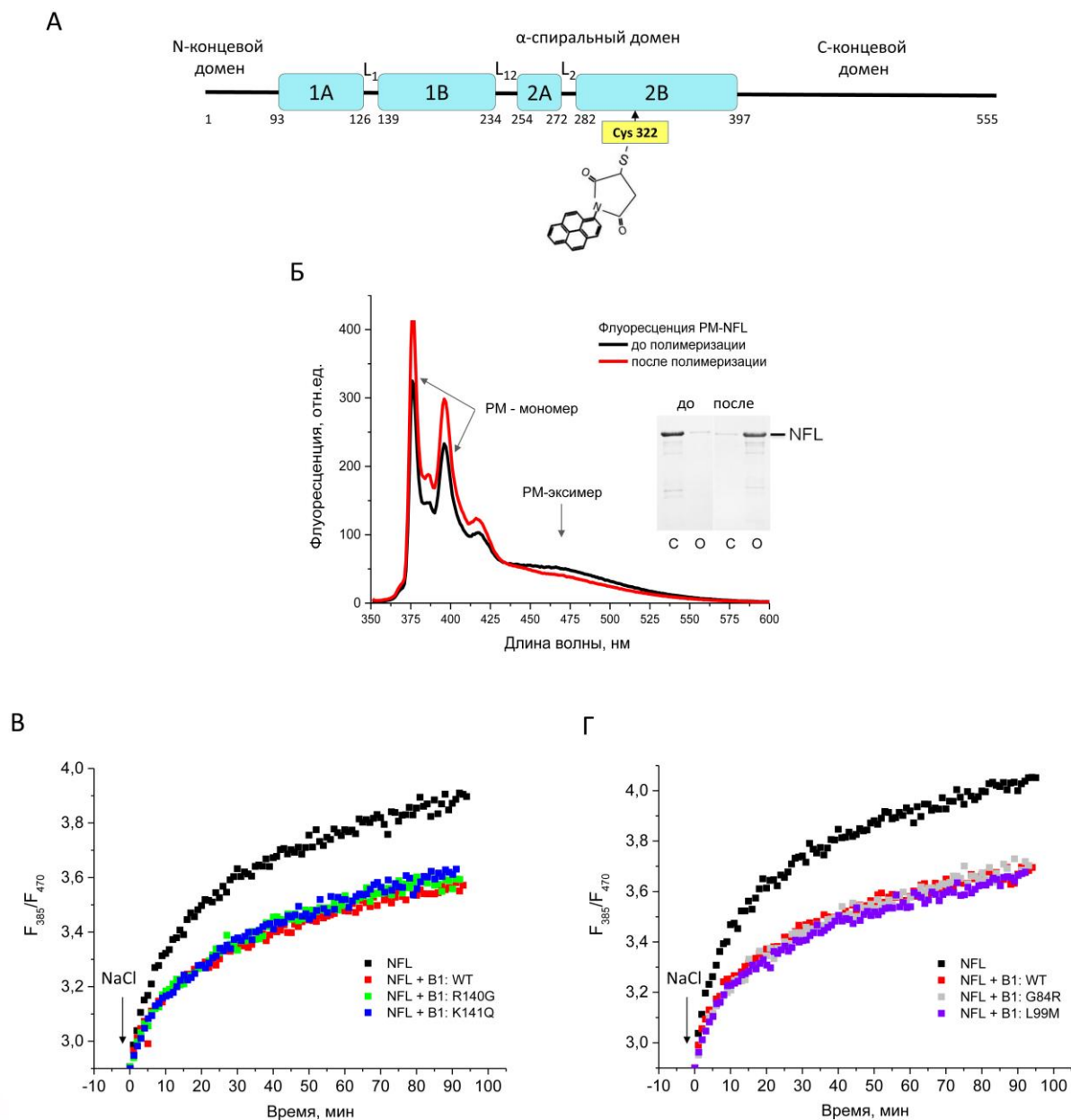


Рис. 32. Исследование взаимодействия малого белка теплового шока HspB1 с белком NFL, меченным пиренилмалеимидом (PM-NFL). **А.** Схема модификации NFL пиренилмалеимидом по единственному остатку Cys322 в спирали 2В. **Б.** Спектры флуоресценции PM-NFL до (черная кривая) и после (красная кривая) полимеризации. Во врезке представлена электрофореграмма супернатанта (С) и осадка (О) проб после высокоскоростного центрифугирования при 105000 g. **В и Г.** Кинетика полимеризации PM-NFL в отсутствие (черная кривая) и в присутствии HspB1 дикого типа (красные кривые) и его мутантных форм (синяя, зеленые, серая и фиолетовые кривые). Момент инициации полимеризации, индуцированной добавлением NaCl, отмечен стрелкой. Молярное отношение NFL/HspB1 составляло 2/1.

Для анализа использовали отношение флуоресценции при 385 нм (F_{385}) к флуоресценции при 470 нм (F_{470}). Полимеризация PM-NFL сопровождается увеличением F_{385}/F_{470} 2,9 до 3,87 за 90 мин (рис. 32В, черная кривая). Добавление HspB1 приводит к ингибированию полимеризации, при этом соотношение F_{385}/F_{470} за это время увеличивается до 3,6 (рис. 31В, красная кривая). Использование мутантных форм белка также приводит к ингибированию полимеризации, при этом нам не удалось выявить существенных различий между HspB1 дикого типа и двумя мутантными формами этого белка (рис. 32 В,Г).

3.8. Изучение взаимодействия NFL с различными малыми белками теплового шока человека

Как уже отмечалось в обзоре литературы, семейство малых белков теплового шока человека включает 10 представителей, при этом в нервной ткани экспрессируются 4 представителя семейства: HspB1, HspB5, HspB6 и HspB8 [57]. Методами дифференциального центрифугирования было показано, что, так же как и HspB1, все исследованные малые белки теплового шока предотвращают осаждение пучков филаментов при низкоскоростном центрифугировании (рис. 33А). Аналогично HspB1 полимеризация филаментов в присутствии HspB5 (α В-кристаллина) сопровождается увеличением количества NFL в супернатанте после высокоскоростного центрифугирования, что указывает на ингибирующий эффект HspB5 на полимеризацию филаментов. Аналогичный эффект был выявлен и в случае HspB8. При этом малый белок теплового шока HspB6 практически не влиял на полимеризацию нейрофиламентов. Малый белок теплового шока HspB5 (α В-кристаллин) эффективно предотвращает полимеризацию модифицированного флуоресцентной NFL (PM-NFL) (рис. 33 В). Как видно, за 90 мин инкубации полимеризация PM-NFL приводит к увеличению F_{385}/F_{470} с 2,9 до 3,9 (рис. 33В, черная кривая). В то время, как добавление HspB5 сопровождается увеличением F_{385}/F_{470} всего лишь до 3,57 (рис. 33В, зеленая кривая). Два других малых белка теплового шока HspB6 и HspB8 менее эффективны в регуляции полимеризации белка легкой цепи нейрофиламентов (рис. 33В, синяя и оранжевые кривые).

Для объяснения полученных результатов мы оценили способность указанных представителей семейства sHsp взаимодействовать с полимеризованными филаментами NFL методом высокоскоростного соосаждения при 105000 g (схема эксперимента см. рис. 9В).

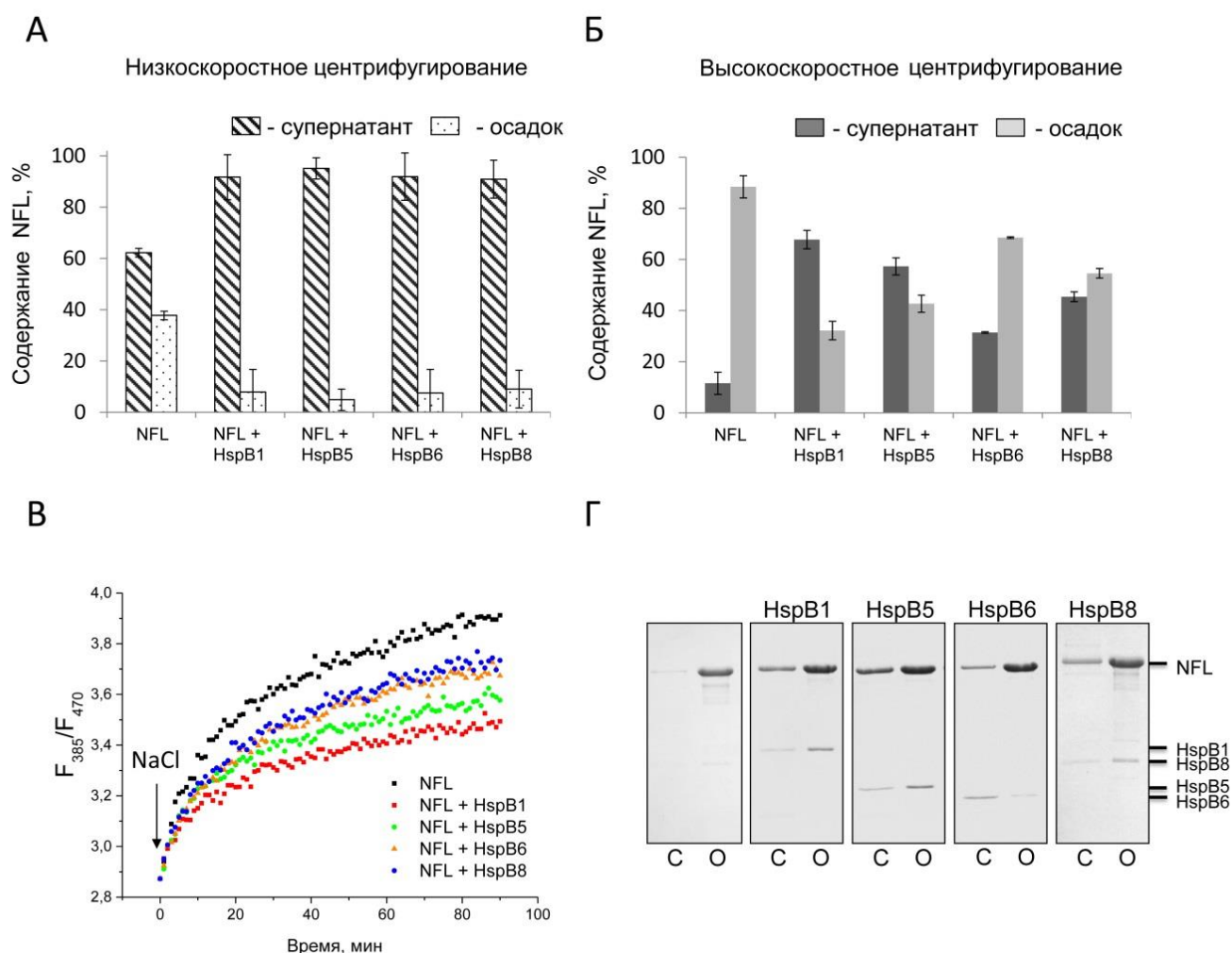


Рис. 33. Взаимодействие различных малых белков теплового шока с NFL. **А.** Распределение NFL между супернатантом и осадком после низкоскоростного центрифугирования филаментов NFL, полученных в присутствии различных малых белков теплового шока. Молярное отношение NFL/sHsp составляло 1/1 (по 10 μ M). Представлены результаты (среднее $\pm$ стандартное отклонение), полученные в четырех независимых экспериментах. **Б.** Распределение NFL между супернатантом и осадком после высокоскоростного центрифугирования филаментов, полученных в присутствии различных малых белков теплового шока. Молярное отношение NFL/sHsp составляло 1/1 (по 10 μ M). Представлены результаты (среднее $\pm$ стандартное отклонение) четырех независимых экспериментов. **В.** Кинетика полимеризации PM-NFL в отсутствие (черная кривая) и в присутствии различных sHsp (красная, синяя, оранжевая и зеленые кривые). Инициация полимеризации, индуцированная NaCl, отмечена стрелкой. Молярное отношение NFL/sHsp составляло 2/1. **Г.** Электрофореграмма образцов, полученных после высокоскоростного центрифугирования (105000 g) смеси нейрофиламентов с различными малыми белками теплового шока. Молярное отношение NFL/sHsp составляло 9/1 (18 μ M NFL и 2 μ M sHsp). С – супернатант, О – осадок.

Малые белки теплового шока HspB5 (α B-кристаллин) и HspB8 взаимодействуют с филаментами NFL и обнаруживаются во фракциях осадков после высокоскоростного центрифугирования (рис. 33Г). Малый белок теплового шока HspB6 практически не взаимодействует с филаментами. Полученные результаты хорошо согласуются с результатами, показывающими, что HspB6 практически не влияет на полимеризацию NFL. Схожее влияние HspB1 и HspB5 на процессы полимеризации NFL, по-видимому, объясняются крупными размерами олигомеров. На основании филогенетического дерева sHsp человека [172, 173] малый белок теплового шока HspB8 близок по своей первичной структуре к HspB1 и, вероятно, поэтому также оказывает влияние на процессы полимеризации NFL, хотя и в меньшей степени, чем HspB1 или HspB5. HspB6 – единственный из исследованных представителей семейства sHsp, который по своей первичной структуре значительно отличается от остальных исследованных белков. Вероятно, этим и объясняется его слабое взаимодействие с NFL и незначительные эффекты на процессы полимеризации филаментов.

Обсуждение результатов

Целью нашего исследования была подробная характеристика нескольких мутантных форм HspB1, содержащих точечные замены в α -кристаллиновом домене (ACD) и на границе N-концевого домена и ACD. Экспрессия белков с точечными аминокислотными заменами G84R, L99M, R140G и K141Q коррелирует с возникновением различных нейродегенеративных заболеваний, таких, как болезнь Шарко-Мари-Тута 2 типа и дистальная врожденная моторная невропатия. С использованием различных методов мы исследовали структуру и некоторые свойства этих мутантных форм HspB1 (табл. 8).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что структура и свойства мутантного белка с заменой R140G в наибольшей степени отличаются от белка дикого типа. Олигомеры этой мутантной формы белка чрезвычайно нестабильны и легко диссоциируют до малых олигомеров. Полученные нами результаты хорошо согласуются с данными, полученными на HspB1 китайского хомячка с точечной заменой R148G, которая гомологична замене R140G в HspB1 человека [174]. Анализируя четвертичную структуру рекомбинантного белка HspB1 R148G методами гель-фильтрации и центрифугирования в градиенте плотности глицерина, авторы установили, что замена R148G приводит к диссоциации крупных олигомеров HspB1 и накоплению малых олигомеров. В своей работе Чавез-Зобел и соавт. исследовали распределение кажущихся молекулярных масс HspB1 дикого типа и его мутантной формы R148G в клетках линии NIH3T3, трансфицированных плазмидами, содержащими кДНК соответствующих белков. Суть использованного ими подхода состояла в использовании

метода химического сшивания глутаровым альдегидом белков клеточного лизата с последующим анализом распределения кажущихся молекулярных масс методом Western Blotting. В данных условиях мутантная форма с точечной заменой R148G обнаруживалась преимущественно в белковых комплексах с малой кажущейся молекулярной массой (до 116 кДа), в то время как белок дикого типа детектировался даже в белковых комплексах с кажущейся молекулярной массой значительно больше, чем 200 кДа. В определенной степени эти результаты согласуются с проведенным нами анализом распределения кажущихся молекулярных масс в лизате клеток линии HEK293F, стабильно синтезирующих белок HspB1 дикого типа и его мутантную форму с заменой R140G. Используя метод гель-фильтрации (рис. 18), мы показали, что в условиях *in vivo* мутантная форма белка также детектируется преимущественно в комплексах с кажущейся молекулярной массой ~100 кДа.

Уже после начала настоящей работы Эллиот и соавт. была опубликована статья, в которой методом гель-фильтрации была изучена четвертичная структуры мутантного HspB1 человека с заменой R140G [80]. Кажущаяся молекулярная масса олигомеров мутантной формы белка, определенная в этой работе, составила ~100 кДа, что хорошо согласуется с результатами нашей работы. Суммируя полученные результаты и данные литературы, можно заключить, что точечная аминокислотная замена консервативного остатка аргинина 140 в центральной части α -кристаллинового домена сопровождается дестабилизацией олигомерной структуры HspB1 и способствует диссоциации олигомеров этого белка. В 2010 году была опубликована работа Альмейда-Соуза и соавторов [97], в которой анализировалась олигомерная структура трех мутантных форм HspB1 с точечными заменами R127W, S135F и R136W, экспрессия которых также коррелирует с развитием периферических невропатий. В этой выполненной на клеточном уровне работе было показано, что практически все указанные замены в центральной части α -кристаллинового домена приводят к тому, что в клетке все анализируемые мутантные формы представлены в виде малых олигомеров. Утверждение авторов о том, что указанные замены приводят к диссоциации олигомеров HspB1 вплоть до мономеров вызывает сомнение. Тем не менее, совокупность представленных в статье экспериментальных данных как будто свидетельствует о том, что любые а.к. замены в центральной части кристаллинового домена приводят к диссоциации крупных олигомеров HspB1. Согласно полученным нами результатам, картина оказывается много более сложной. При высокой концентрации мутантная форма R140G склонна к образованию ассоциатов (агрегатов), размеры которых значительно превышают размеры олигомеров, образованных белком дикого типа (см. табл. 7). В предварительных экспериментах, проведенных в нашей лаборатории, было показано, что проанализированные в работе Альмейда-Соуза и соавторов [97] мутантные формы HspB1 с

точечными заменами R127W, S135F и R136W при высокой концентрации или в присутствии краудинг агентов также склонны к образованию огромных ассоциатов, размеры которых превышают размеры олигомеров HspB1 дикого типа (неопубликованные данные). Таким образом, создается впечатление, что замены в центральной части кристаллинового домена дестабилизируют мономер-мономерные взаимодействия, но не препятствуют, а, наоборот, способствуют образованию неправильно упакованных крупных ассоциатов (агрегатов) HspB1. Тем не менее, на примере HspB1 с заменой R140G мы видим, что такие агрегаты могут быть нестабильными и могут легко диссоциировать. На сегодняшний день в литературе отсутствуют данные о кристаллической структуре олигомера HspB1, однако имеется достаточно информации об организации кристаллиновых доменов различных малых белков теплового шока. Мы обратились к профессору лаборатории Биокристаллографии департамента Фармацевтических и Фармакологических наук (KU Leuven, Бельгия) С.В. Стрелкову с просьбой промоделировать структуру кристаллинового домена HspB1, которая бы учитывала данные литературы по упаковке этих доменов различных sHsp (рис. 34А). Согласно модели, созданной профессором Стрелковым, соседние остатки Arg140 и Lys141 повернуты в разные стороны и располагаются напротив остатков Asp129 и Glu126 соседнего мономера, формируя солевые мостики, стабилизирующие димер. При этом солевой мостик Arg140-Asp129 располагается «в глубине» канавки, разделяющей соседние мономеры, а мостик Lys141-Glu126 располагается на краю β 7-складки. Таким образом, вклад этих солевых мостиков в стабилизации димера HspB1 должен достаточно существенно различаться. При этом значимость солевого мостика, образованного остатками Arg140-Asp129 превосходит значимость солевого мостика, образованного остатками Lys141-Glu126. Вероятно, именно поэтому свойства мутантной формы с заменой R140G более значительно отличаются от свойств белка дикого типа, чем свойства мутантной формы с заменой K141Q.

Таблица 8. Сравнение некоторых свойств HspB1 дикого типа и его точечных мутантных форм.

Белок HspB1	Четвертичная структура	Шапероноподобная активность	Устойчивость к протеолизу	Термостабильность	Спектральные свойства
WT	Крупные стабильные олигомеры				
G84R	Крупные, но нестабильные олигомеры, легко диссоциирующие при фосфорилировании MARKAPK2 или понижении концентрации	-	+	±	Незначительное увеличение триптофановой флуоресценции
L99M	Крупные, но нестабильные олигомеры, легко диссоциирующие при фосфорилировании MARKAPK2 или понижении концентрации	-	+	±	Незначительно увеличение триптофановой флуоресценции
R140G	Агрегаты или крупные чрезвычайно нестабильные олигомеры, легко диссоциирующие до димеров/тетрамеров	--	--	-	Значительное уменьшение триптофановой флуоресценции
K141Q	Крупные стабильные олигомеры	±	++	-	Триптофановая флуоресценция не изменяется

Обозначения: «+» - стабилизирующий/положительный эффект; «++» - значительный стабилизирующий/положительный эффект; «-» - дестабилизирующий/отрицательный эффект; «--» - значительный дестабилизирующий эффект; «±» - незначительный/невыраженный эффект точечной а.к. замены

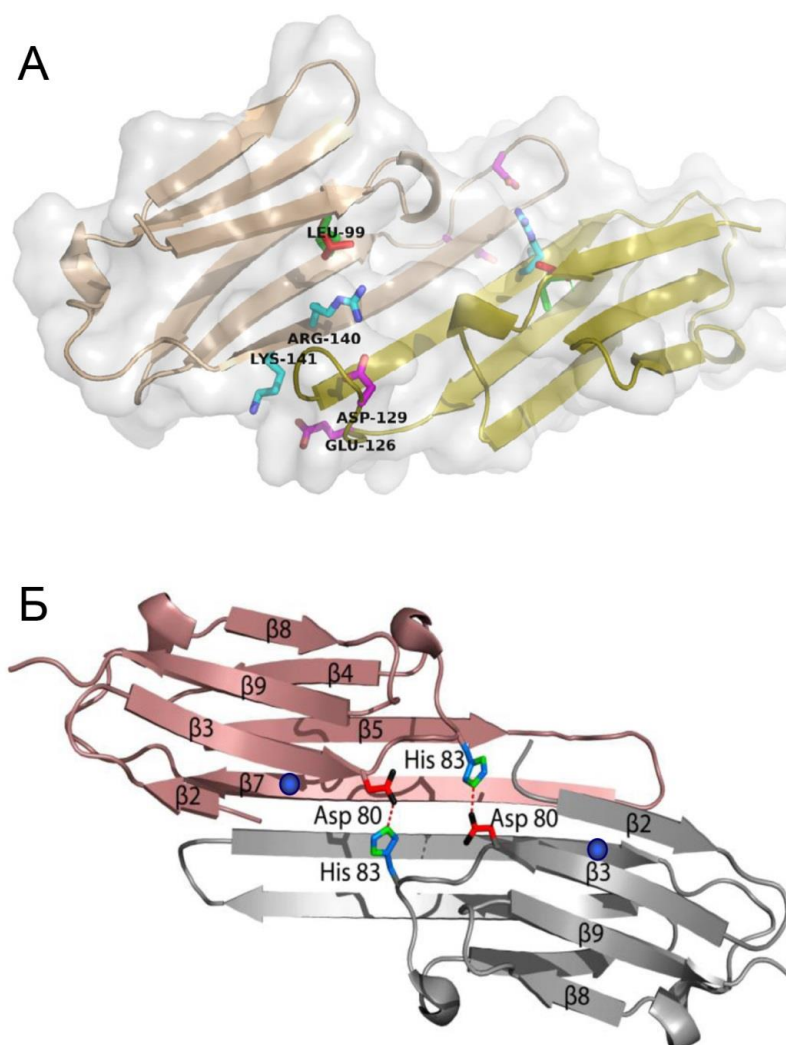


Рис. 34. А. Моделирование структуры димера α -кристаллиновых доменов HspB1. Моделирование проведено на основе рентгеноструктурных данных, полученных на изолированных кристаллиновых доменах HspB1 (PDB ID: 3Q9Q), и HspB5 (PDB ID: 2WJ7). Желтым и бежевым цветом обозначены α -кристаллиновые домены двух мономеров HspB1. Синим цветом показаны остатки Arg140 и Lys141 в составе β 7-складки; розовым – остатки Asp129 и Glu126 в составе петли, соединяющей β 5- и β 7-складки, красным – остаток L99 в составе β 3-складки. **Б. Димер кристаллиновых доменов α В-кристаллина с заменой R120G (PDB ID: 2Y1Z).** Серым и розовым цветом показаны α -кристаллиновые домены двух соседних мономеров. Красным и зеленым цветами показаны остатки Asp80 и His83. Синим кружком обозначен Gly120. Красной пунктирной линией показан солевой мостик между Asp80 и His83.

Анализируя структуру и свойства мутантной формы HspB1 с точечной заменой R140G, стоит проанализировать структуру и свойства родственных малых белков теплового шока. Оказалось, что центральная часть кристаллинового домена имеет высоко консервативную структуру и практически все малые белки теплового шока имеют в гомологичной позиции остаток аргинина. Более того, описано несколько точечных замен

этого остатка в разных малых белках теплового шока. Например, достаточно давно описаны замены R116C в структуре HspB4 и R120G в структуре HspB5. Эти замены коррелируют с развитием различных наследственных заболеваний. Точечная замена R116C в α A-кристаллине (HspB4), преимущественно экспрессируемом в хрусталике глаза, сопровождается развитием катаракты, т.е. помутнением хрусталика, обусловленным агрегацией белков. Точечная замена R120G повсеместно экспрессируемого α B-кристаллина (HspB5) может сопровождаться развитием катаракты, десмин-зависимой миопатии и некоторых форм кардиомиопатий. Мутантные формы кристаллинов склонны к агрегации и образуют олигомеры (агрегаты), размеры которых существенно больше размеров олигомеров, формируемых белками дикого типа. Кроме того, указанные мутантные формы, как правило, обладают меньшей шапероноподобной активностью и существенно отличаются по третичной структуре от соответствующих белков дикого типа [159, 175]. Кларк и соавт. [19] исследовали пространственную структуру кристаллинового домена мутантной формы α B-кристаллина с заменой R120G (рис. 34Б). Как и следовало ожидать, данные рентгеноструктурного анализа подтвердили, что α -кристаллиновые домены α B-кристаллина формируют стабильные димеры, контактирующие антипараллельно расположенными β 7-складками. Как уже было сказано, для формирования стабильного димера α B-кристаллина дикого типа (HspB5) необходимы водородные связи и солевые мостики, образуемые β 7-складками соседних мономеров. Важная роль в стабилизации этих взаимодействий принадлежит солевому мостику, образованному остатками R120-D109. Замена R120G делает невозможным образование этого солевого мостика, а вместо него становится возможным образование необычного солевого мостика между D80 (β 3 складка) одного мономера и H83 (петля между β 3 и β 4) другого мономера (рис. 34Б). Образование такого необычного мостика сопровождается изменениями в структуре HspB5. Таким образом, замена R120G HspB5 не только влияет на контакты, образованные двумя антипараллельными β 7 складками, но затрагивает и структуру β 3-складки HspB5, что приводит к очень существенным изменениям структуры мономера и, вероятно, олигомера белка. Как уже отмечалось, малые белки теплового шока высоко гомологичны, поэтому можно предположить, что аналогичные изменения происходят и в структуре HspB1 с заменой R140G, где соответствующие положения заняты остатками Asp100 и His103. Предположение о том, что точечная замена R140G влияет на ориентацию β 3 складки HspB1 косвенно подтверждается обнаруженными изменениями триптофановой флуоресценции. Действительно, один из остатков триптофана HspB1 (Trp95) расположен именно в этой β -складке. Суммируя представленные данные, можно заключить, что замена R140G не только ослабляет межмономерные взаимодействия,

но и оказывает влияние на общую структуру белка, вследствие чего нестабильные олигомеры мутантной формы белка оказываются склонными к агрегации и ассоциации.

Анализ влияния замены G84R на структуру HspB1 представляется достаточно сложным ввиду отсутствия детальной информации о структуре N-концевого домена белка. Данный аминокислотный остаток высоко консервативен в структуре малых белков теплового шока (рис. 1Б) [94]. Вероятно, это может быть связано с тем, что N-концевой домен обладает высокой подвижностью, которая может обеспечиваться только наличием маленького остатка глицина, расположенного в области «шарнира». Замена маленького незаряженного остатка глицина на объемный заряженный остаток аргинина может ограничивать подвижность N-концевого домена, играющего важную роль в стабилизации олигомеров HspB1. Вероятно, именно поэтому замена G84R влияет на олигомерное состояние исследуемого белка (см. рис.17). Остаток Leu99 также достаточно консервативен в первичной структуре малых белков теплового шока человека (рис. 1Б). Данные Барановой и соавт. указывают на то, что Leu99 находится в гидрофобном кармане [6], расположенном поблизости от остатка Arg140 и от межмономерных контактов, в основном формируемых за счет двух антипараллельных $\beta 7$ складок соседних мономеров HspB1. Такое расположение существенно для поддержания правильной структуры мономеров и их устойчивого взаимодействия, хотя остается не очень понятным, почему замена лейцина на консервативный остаток метионина может каким-то существенным образом влиять на общую структуру белка. Подводя итог исследованию физико-химических свойств анализируемых мутантных форм HspB1, можно заключить, что практически все исследованные мутантные формы отличаются от белка дикого типа по своей олигомерной структуре, стабильности образуемых олигомеров, а также по способности взаимодействовать с белками-партнерами (HspB6) и белками-субстратами. Например, при использовании в качестве субстратов изолированных белков шапероноподобная активность всех анализируемых мутантных форм была, как правило, меньше аналогичной активности белка дикого типа (см рис. 25). Все эти различия в свойствах могут быть причиной того, что экспрессия анализируемых мутантных форм может коррелировать с развитием нейродегенеративных заболеваний.

Мы предположили, что патологии, возникающие при экспрессии мутантных форм HspB1, могут быть связаны с нарушением взаимодействия HspB1 с одним из компонентов цитоскелета, промежуточными филаментами. Исследованию взаимодействия малых белков теплового шока с белками промежуточных филаментов посвящено много работ (см., например, [165]). Ранее в литературе высказывались предположения о том, что периферические невропатии могут быть связаны с нарушением цитоскелета аксонов

нервных клеток, и эти нарушения могут быть вызваны с заменами в структуре HspB1. Несмотря на то, что в ряде исследований было показано, что экспрессия мутантных форм HspB1 (S135F и P182L) приводит к агрегации белков нейрофиламентов [102, 109], возможность прямого взаимодействия между белками нейрофиламентов и малыми белками теплового шока ранее подробно не анализировалась. В данной работе мы исследовали участие HspB1 в процессе полимеризации белка легкой цепи нейрофиламентов (NFL). Методами дифференциального центрифугирования, аналитического ультрацентрифугирования и флуоресцентной спектроскопии мы установили, что HspB1 препятствует пучкованию филаментов, образованных белком легкой цепи нейрофиламентов (NFL), и ингибирует процесс полимеризации NFL (рис. 27-31). Наши данные свидетельствуют о том, что HspB1 не взаимодействует с NFL на ранних стадиях полимеризации (тетрамеры), но эффективно влияет на более поздние стадии полимеризации и способен связываться с полимеризованными филаментами NFL (рис. 29, 31). Ранее Кайзер и соавт. [81] показали, что HspB1 способен эффективно предотвращать полимеризацию кератинов (K8/K18) (других белков, относящихся к семейству белков промежуточных филаментов), что согласуется с нашими результатами. В тоже время авторы данного исследования утверждают, что HspB1 взаимодействует даже с тетрамерами K8/K18 цитокератинов. Это утверждение не согласуется с нашими результатами, полученными при исследовании легкой цепи нейрофиламентов. Это противоречие может быть связано со многими причинами. Очевидно, что, несмотря на значительное сходство, как белки, входящие в семейство малых белков теплового шока, так и белки, входящие в семейство белков промежуточных филаментов, достаточно существенно отличаются друг от друга. Поэтому трудно ожидать, что механизм взаимодействия этих белков будет одинаковым для всех представителей этих семейств.

В литературе были предприняты попытки картировать участки α B-кристаллина (HspB5), ответственные за его взаимодействие с десмином. В ходе этих исследований было высказано предположение, что аминокислотные остатки 73-85 (β 3-складка), 131-138 (β 8-складка) и 155-165 С-концевого домена участвуют во взаимодействии HspB5 с десмином [176, 177]. Как минимум одна из исследуемых нами замен (L99M) располагается в β 3 складке. Поэтому можно было предположить, что анализируемые аминокислотные замены каким-то образом повлияют на взаимодействие HspB1 с легкой цепью нейрофиламентов. Однако использованный нами метод не позволили выявить каких-то существенных различий во взаимодействии HspB1 дикого типа и его мутантных форм с NFL (рис. 32).

Следует заметить, что первичная структура малых белков теплового шока в области β 8- и особенно β 3-складок высоко консервативна (рис.1). Тем не менее, полученные нами

результаты свидетельствуют о том, что малые белки теплового шока довольно существенно отличаются по своей способности взаимодействовать с NFL (см рис. 33). Этот факт, по всей видимости, означает, что во взаимодействии с белками промежуточных филаментов участвует не один, а несколько центров, расположенных в разных участках малых белков теплового шока. Вследствие этого взаимодействие малых белков теплового шока с белками промежуточных филаментов определяется не только (и не столько) их первичной структурой, но может зависеть от большого количества дополнительных факторов, таких как олигомерное состояние белков теплового шока или их способности образовывать гетероолигомерные комплексы. Например, можно предположить, что, хотя исследуемые замены не влияют на прямое взаимодействие HspB1 с NFL, они изменяют взаимодействие HspB1 с HspB6 и таким образом опосредованно влияют на процессы сборки/разборки или нормального функционирования промежуточных филаментов. Нет сомнения в том, что потребуются обширные дополнительные исследования для проверки этого предположения.

Заключение

Малые белки теплового шока (sHsp) – разнообразная группа АТФ-независимых белков-шаперонов, распространенная во всех царствах живой природы. Эти белки участвуют в регуляции большого числа внутриклеточных процессов, именно поэтому аминокислотные замены в sHsp могут приводить к возникновению и развитию различных врожденных заболеваний человека. В настоящее время описано более 20 мутаций в гене малого белка теплового шока HspB1, коррелирующих с развитием невропатий периферической нервной системы (болезни Шарко-Мари-Тута 2 типа и дистальной врожденной моторной невропатии) [86]. Молекулярные механизмы развития этих патологий остаются мало исследованными. По этой причине на первом этапе представлялось целесообразным исследовать физико-химические свойства нескольких мутантных форм HspB1 и проанализировать взаимодействие HspB1 и его мутантных вариантов с одним из белков цитоскелета нейронов, легкой цепью нейрофиламентов. В ходе выполнения работы были получены гомогенные препараты рекомбинантного малого белка теплового шока человека HspB1 и четыре мутантные формы этого белка с точечными заменами на границе N-концевого и α -кристаллинового доменов (G84R), в начале (L99M) и в середине (R140G, K141Q) кристаллинового домена. Использование нескольких методов позволило выявить различия в структуре и свойствах белка дикого типа и его мутантных форм. Замена R140G вызывала наибольшие изменения в структуре и свойствах исследуемого белка. Эта точечная замена приводила с одной стороны к дестабилизации олигомерной структуры, а с другой стороны увеличивала вероятность агрегации исследуемого белка. При использовании изолированных модельных белков-субстратов мутантная форма R140G обладала наименьшей шапероноподобной активностью. Остаток R140 HspB1 располагается в так называемой «горячей точке», т.е. в участке, аминокислотные замены в котором приводят к драматическим изменениям свойств нескольких малых белков теплового шока (HspB5 (α B-кристаллина) [178], HspB4 (α A-кристаллина) [179] и HspB8 [180]). Моделирование структуры α -кристаллинового домена свидетельствует о том, что точечная замена R140G HspB1 предотвращает образование солевого мостика с Asp129 и таким образом приводит к дестабилизации межмономерных взаимодействий и общему изменению структуры олигомера.

Две другие точечные замены, расположенные на границе (G84R) и в самом начале (L99M) кристаллинового домена также сопровождаются дестабилизацией олигомерной структуры HspB1. Вследствие этого увеличивается вероятность индуцированной фосфорилированием диссоциации олигомеров HspB1. Сделан вывод, что а.к. замены в

кристаллиновом домене, как правило, ослабляют межмономерные взаимодействия и сопровождаются существенными изменениями в олигомерной структуре HspB1. Вследствие этого изменяется взаимодействие HspB1 с белками-партнерами (HspB6) и белками-субстратами. Проведенные исследования расширяют представления о структуре и механизме функционирования малых белков теплового шока.

В связи с тем, что развитие дистальных невропатий может быть связано с нарушениями функционирования цитоскелета, было проведено исследование взаимодействия различных малых белков теплового шока с белком легкой цепи нейрофиламентов (NFL). Установлено, что HspB1 и HspB5 взаимодействуют с NFL и ингибируют процесс самосборки промежуточных филаментов. HspB8 и, особенно, HspB6 менее эффективно взаимодействуют с NFL и оказывают меньшее влияние на полимеризацию промежуточных филаментов. Анализируемые точечные а.к. замены напрямую не влияют на взаимодействие HspB1 с NFL, однако при этом нельзя исключить опосредованного влияния указанных аминокислотных замен на функционирование цитоскелета нервных клеток.

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 агрегации и диссоциации. 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 литературы

1. Ecroyd, H. and Carver, J.A., *Crystallin proteins and amyloid fibrils*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(1): p. 62-81.
2. Hartl, F.U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M., *Molecular chaperones in protein folding and proteostasis*. Nature, 2011. **475**(7356): p. 324-32.
3. Jackson, S.E., *Hsp90: structure and function*. Topics in Current Chemistry, 2013. **328**: p. 155-240.
4. Mattoo, R.U. and Goloubinoff, P., *Molecular chaperones are nanomachines that catalytically unfold misfolded and alternatively folded proteins*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2014. **71**(17): p. 3311-25.
5. Mymrikov, E.V., Seit-Nebi, A.S., and Gusev, N.B., *Large potentials of small heat shock proteins*. Physiol Rev, 2011. **91**(4): p. 1123-59.
6. Baranova, E.V., Weeks, S.D., Beelen, S., Bukach, O.V., Gusev, N.B., and Strelkov, S.V., *Three-dimensional structure of alpha-crystallin domain dimers of human small heat shock proteins HSPB1 and HSPB6*. Journal of Molecular Biology, 2011. **411**(1): p. 110-22.
7. Hilton, G.R., Lioe, H., Stengel, F., Baldwin, A.J., and Benesch, J.L., *Small heat-shock proteins: paramedics of the cell*. Top Curr Chem, 2013. **328**: p. 69-98.
8. Kim, K.K., Kim, R., and Kim, S.H., *Crystal structure of a small heat-shock protein*. Nature, 1998. **394**(6693): p. 595-9.
9. van Montfort, R.L., Basha, E., Friedrich, K.L., Slingsby, C., and Vierling, E., *Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(12): p. 1025-30.
10. Stamler, R., Kappe, G., Boelens, W., and Slingsby, C., *Wrapping the alpha-crystallin domain fold in a chaperone assembly*. J Mol Biol, 2005. **353**(1): p. 68-79.
11. Takeda, K., Hayashi, T., Abe, T., Hirano, Y., Hanazono, Y., Yohda, M., and Miki, K., *Dimer structure and conformational variability in the N-terminal region of an archaeal small heat shock protein, StHsp14.0*. J Struct Biol, 2011. **174**(1): p. 92-9.
12. Hilario, E., Martin, F.J., Bertolini, M.C., and Fan, L., *Crystal structures of Xanthomonas small heat shock protein provide a structural basis for an active molecular chaperone oligomer*. J Mol Biol, 2011. **408**(1): p. 74-86.
13. Sluchanko, N.N., Beelen, S., Kulikova, A.A., Weeks, S.D., Antson, A.A., Gusev, N.B., and Strelkov, S.V., *Structural Basis for the Interaction of a Human Small Heat Shock Protein with the 14-3-3 Universal Signaling Regulator*. Structure, 2017. **25**(2): p. 305-316.
14. Bagnieris, C., Bateman, O.A., Naylor, C.E., Cronin, N., Boelens, W.C., Keep, N.H., and Slingsby, C., *Crystal structures of alpha-crystallin domain dimers of alphaB-crystallin and Hsp20*. J Mol Biol, 2009. **392**(5): p. 1242-52.
15. Mymrikov, E.V., Daake, M., Richter, B., Haslbeck, M., and Buchner, J., *The Chaperone Activity and Substrate Spectrum of Human Small Heat Shock Proteins*. Journal of Biological Chemistry, 2017. **292**(2): p. 672-684.

16. Rogalla, T., Ehrnsperger, M., Preville, X., Kotlyarov, A., Lutsch, G., Ducasse, C., Paul, C., Wieske, M., Arrigo, A.P., Buchner, J., and Gaestel, M., *Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation*. J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 18947-56.
17. Bukach, O.V., Seit-Nebi, A.S., Marston, S.B., and Gusev, N.B., *Some properties of human small heat shock protein Hsp20 (HspB6)*. Eur J Biochem, 2004. **271**(2): p. 291-302.
18. Kim, M.V., Seit-Nebi, A.S., Marston, S.B., and Gusev, N.B., *Some properties of human small heat shock protein Hsp22 (H11 or HspB8)*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **315**(4): p. 796-801.
19. Clark, A.R., Naylor, C.E., Bagneris, C., Keep, N.H., and Slingsby, C., *Crystal structure of R120G disease mutant of human alphaB-crystallin domain dimer shows closure of a groove*. J Mol Biol, 2011. **408**(1): p. 118-34.
20. Sudnitsyna, M.V., Mymrikov, E.V., Seit-Nebi, A.S., and Gusev, N.B., *The role of intrinsically disordered regions in the structure and functioning of small heat shock proteins*. Curr Protein Pept Sci, 2012. **13**(1): p. 76-85.
21. Laganowsky, A., Benesch, J.L., Landau, M., Ding, L., Sawaya, M.R., Cascio, D., Huang, Q., Robinson, C.V., Horwitz, J., and Eisenberg, D., *Crystal structures of truncated alphaA and alphaB crystallins reveal structural mechanisms of polydispersity important for eye lens function*. Protein Sci, 2010. **19**(5): p. 1031-43.
22. Hochberg, G.K., Ecroyd, H., Liu, C., Cox, D., Cascio, D., Sawaya, M.R., Collier, M.P., Stroud, J., Carver, J.A., Baldwin, A.J., Robinson, C.V., Eisenberg, D.S., Benesch, J.L., and Laganowsky, A., *The structured core domain of alphaB-crystallin can prevent amyloid fibrillation and associated toxicity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014. **111**(16): p. E1562-70.
23. Datskevich, P.N., Nefedova, V.V., Sudnitsyna, M.V., and Gusev, N.B., *Mutations of small heat shock proteins and human congenital diseases*. Biochemistry (Mosc), 2012. **77**(13): p. 1500-14.
24. Zavialov, A., Benndorf, R., Ehrnsperger, M., Zav'yalov, V., Dudich, I., Buchner, J., and Gaestel, M., *The effect of the intersubunit disulfide bond on the structural and functional properties of the small heat shock protein Hsp25*. Int J Biol Macromol, 1998. **22**(3-4): p. 163-73.
25. Mymrikov, E.V., Seit-Nebi, A.S., and Gusev, N.B., *Heterooligomeric complexes of human small heat shock proteins*. Cell Stress Chaperones, 2012. **17**(2): p. 157-69.
26. Rajagopal, P., Liu, Y., Shi, L., Clouser, A.F., and Klevit, R.E., *Structure of the alpha-crystallin domain from the redox-sensitive chaperone, HSPB1*. Journal of Biomolecular NMR, 2015. **63**(2): p. 223-8.
27. Jehle, S., Rajagopal, P., Bardiaux, B., Markovic, S., Kuhne, R., Stout, J.R., Higman, V.A., Klevit, R.E., van Rossum, B.J., and Oschkinat, H., *Solid-state NMR and SAXS studies provide a structural basis for the activation of alphaB-crystallin oligomers*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(9): p. 1037-42.

28. Pasta, S.Y., Raman, B., Ramakrishna, T., and Rao Ch, M., *The IXI/V motif in the C-terminal extension of alpha-crystallins: alternative interactions and oligomeric assemblies*. Mol Vis, 2004. **10**: p. 655-62.
29. Studer, S., Obrist, M., Lentze, N., and Narberhaus, F., *A critical motif for oligomerization and chaperone activity of bacterial alpha-heat shock proteins*. Eur J Biochem, 2002. **269**(14): p. 3578-86.
30. Andley, U.P., Mathur, S., Griest, T.A., and Petrash, J.M., *Cloning, expression, and chaperone-like activity of human alphaA-crystallin*. J Biol Chem, 1996. **271**(50): p. 31973-80.
31. Lelj-Garolla, B. and Mauk, A.G., *Self-association of a small heat shock protein*. J Mol Biol, 2005. **345**(3): p. 631-42.
32. Jehle, S., Vollmar, B.S., Bardiaux, B., Dove, K.K., Rajagopal, P., Gonen, T., Oschkinat, H., and 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. **108**(16): p. 6409-14.
33. Braun, N., Zacharias, M., Peschek, J., Kastenmuller, A., Zou, J., Hanzlik, M., Haslbeck, M., Rappsilber, J., Buchner, J., and Weinkauff, S., *Multiple molecular architectures of the eye lens chaperone alphaB-crystallin elucidated by a triple hybrid approach*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(51): p. 20491-6.
34. Delbecq, S.P. and Klevit, R.E., *One size does not fit all: the oligomeric states of alphaB crystallin*. FEBS Lett, 2013. **587**(8): p. 1073-80.
35. Aquilina, J.A., Benesch, J.L., Bateman, O.A., Slingsby, C., and Robinson, C.V., *Polydispersity of a mammalian chaperone: mass spectrometry reveals the population of oligomers in alphaB-crystallin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10611-6.
36. Peschek, J., Braun, N., Franzmann, T.M., Georgalis, Y., Haslbeck, M., Weinkauff, S., and Buchner, J., *The eye lens chaperone alpha-crystallin forms defined globular assemblies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(32): p. 13272-7.
37. Inoue, R., Takata, T., Fujii, N., Ishii, K., Uchiyama, S., Sato, N., Oba, Y., Wood, K., Kato, K., and Sugiyama, M., *New insight into the dynamical system of alphaB-crystallin oligomers*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 29208.
38. Giese, K.C., Basha, E., Catague, B.Y., and Vierling, E., *Evidence for an essential function of the N terminus of a small heat shock protein in vivo, independent of in vitro chaperone activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(52): p. 18896-901.
39. Takeuchi, S., *Analytical assays of human HSP27 and thermal-stress survival of Escherichia coli cells that overexpress it*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **341**(4): p. 1252-6.
40. Kayumov, A.R., Bogachev, M.I., Manuvera, V.A., Lazarev, V.N., Sabantsev, A.V., Artamonova, T.O., Borchsenius, S.N., and Vishnyakov, I.E., *[Recombinant small heat shock protein from Acholeplasma laidlawii increases the Escherichia coli viability in thermal stress by selective protein rescue]*. Molekuliarnaia Biologiia, 2017. **51**(1): p. 131-141.

41. Arrigo, A.P. and Pauli, D., *Characterization of HSP27 and three immunologically related polypeptides during Drosophila development*. Exp Cell Res, 1988. **175**(1): p. 169-83.
42. Landry, J., Chretien, P., Laszlo, A., and Lambert, H., *Phosphorylation of HSP27 during development and decay of thermotolerance in Chinese hamster cells*. J Cell Physiol, 1991. **147**(1): p. 93-101.
43. Jovceviski, B., Kelly, M.A., Rote, A.P., Berg, T., Gastall, H.Y., Benesch, J.L., Aquilina, J.A., and Ecroyd, H., *Phosphomimics destabilize Hsp27 oligomeric assemblies and enhance chaperone activity*. Chemistry and Biology, 2015. **22**(2): p. 186-95.
44. Panasencko, O.O., Seit Nebi, A., Bukach, O.V., Marston, S.B., and Gusev, N.B., *Structure and properties of avian small heat shock protein with molecular weight 25 kDa*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1601**(1): p. 64-74.
45. Augusteyn, R.C., *Dissociation is not required for alpha-crystallin's chaperone function*. Exp Eye Res, 2004. **79**(6): p. 781-4.
46. Stromer, T., Ehrnsperger, M., Gaestel, M., and Buchner, J., *Analysis of the interaction of small heat shock proteins with unfolding proteins*. J Biol Chem, 2003. **278**(20): p. 18015-21.
47. Bumagina, Z.M., Gurvits, B.Y., Artemova, N.V., Muranov, K.O., Yudin, I.K., and Kurganov, B.I., *Mechanism of suppression of dithiothreitol-induced aggregation of bovine alpha-lactalbumin by alpha-crystallin*. Biophys Chem, 2010. **146**(2-3): p. 108-17.
48. Hayes, D., Napoli, V., Mazurkie, A., Stafford, W.F., and Graceffa, P., *Phosphorylation dependence of hsp27 multimeric size and molecular chaperone function*. J Biol Chem, 2009. **284**(28): p. 18801-7.
49. Kulig, M. and Ecroyd, H., *The small heat-shock protein alphaB-crystallin uses different mechanisms of chaperone action to prevent the amorphous versus fibrillar aggregation of alpha-lactalbumin*. Biochem J, 2012. **448**(3): p. 343-52.
50. Ecroyd, H. and Carver, J.A., *The effect of small molecules in modulating the chaperone activity of alphaB-crystallin against ordered and disordered protein aggregation*. FEBS J, 2008. **275**(5): p. 935-47.
51. Das, K.P. and Surewicz, W.K., *On the substrate specificity of alpha-crystallin as a molecular chaperone*. Biochem J, 1995. **311** (Pt 2): p. 367-70.
52. Sharma, K.K., Kumar, R.S., Kumar, G.S., and Quinn, P.T., *Synthesis and characterization of a peptide identified as a functional element in alphaA-crystallin*. J Biol Chem, 2000. **275**(6): p. 3767-71.
53. Tanaka, N., Tanaka, R., Tokuhara, M., Kunugi, S., Lee, Y.F., and Hamada, D., *Amyloid fibril formation and chaperone-like activity of peptides from alphaA-crystallin*. Biochemistry, 2008. **47**(9): p. 2961-7.
54. Ghosh, J.G., Houck, S.A., and Clark, J.I., *Interactive sequences in the molecular chaperone, human alphaB crystallin modulate the fibrillation of amyloidogenic proteins*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(5): p. 954-67.
55. Hickey, E.D. and Weber, L.A., *Modulation of heat-shock polypeptide synthesis in HeLa cells during hyperthermia and recovery*. Biochemistry, 1982. **21**(7): p. 1513-21.

56. Moloney, T.C., Hoban, D.B., Barry, F.P., Howard, L., and Dowd, E., *Kinetics of thermally induced heat shock protein 27 and 70 expression by bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Protein Sci, 2012. **21**(6): p. 904-9.
57. Vos, M.J., Kanon, B., and Kampinga, H.H., *HSPB7 is a SC35 speckle resident small heat shock protein*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(8): p. 1343-53.
58. Landry, J., Lambert, H., Zhou, M., Lavoie, J.N., Hickey, E., Weber, L.A., and Anderson, C.W., *Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(2): p. 794-803.
59. Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D.G., Cohen, P., and Gaestel, M., *Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins*. FEBS Lett, 1992. **313**(3): p. 307-13.
60. Kostenko, S. and Moens, U., *Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(20): p. 3289-307.
61. Paul, C., Simon, S., Gibert, B., Viro, S., Manero, F., and Arrigo, A.P., *Dynamic processes that reflect anti-apoptotic strategies set up by HspB1 (Hsp27)*. Exp Cell Res, 2010. **316**(9): p. 1535-52.
62. Eaton, P., Fuller, W., and Shattock, M.J., *S-thiolation of HSP27 regulates its multimeric aggregate size independently of phosphorylation*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21189-96.
63. Horwitz, J., *Alpha-crystallin*. Exp Eye Res, 2003. **76**(2): p. 145-53.
64. Kato, K., Goto, S., Inaguma, Y., Hasegawa, K., Morishita, R., and Asano, T., *Purification and characterization of a 20-kDa protein that is highly homologous to alpha B crystallin*. J Biol Chem, 1994. **269**(21): p. 15302-9.
65. Bukach, O.V., Glukhova, A.E., Seit-Nebi, A.S., and Gusev, N.B., *Heterooligomeric complexes formed by human small heat shock proteins HspB1 (Hsp27) and HspB6 (Hsp20)*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1794**(3): p. 486-95.
66. Heirbaut, M., Lermyte, F., Martin, E.M., Beelen, S., Verschueren, T., Sobott, F., Strelkov, S.V., and Weeks, S.D., *The preferential heterodimerization of human small heat shock proteins HSPB1 and HSPB6 is dictated by the N-terminal domain*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2016. **610**: p. 41-50.
67. Skouri-Panet, F., Michiel, M., Ferard, C., Duprat, E., and Finet, S., *Structural and functional specificity of small heat shock protein HspB1 and HspB4, two cellular partners of HspB5: role of the in vitro hetero-complex formation in chaperone activity*. Biochimie, 2012. **94**(4): p. 975-84.
68. Aquilina, J.A., Shrestha, S., Morris, A.M., and Ecroyd, H., *Structural and functional aspects of hetero-oligomers formed by the small heat shock proteins alphaB-crystallin and HSP27*. J Biol Chem, 2013. **288**(19): p. 13602-9.
69. Miron, T., Vancompernelle, K., Vandekerckhove, J., Wilchek, M., and Geiger, B., *A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein*. The Journal of cell biology, 1991. **114**(2): p. 255-61.

70. Wieske, M., Benndorf, R., Behlke, J., Dolling, R., Grelle, G., Bielka, H., and Lutsch, G., *Defined sequence segments of the small heat shock proteins HSP25 and alphaB-crystallin inhibit actin polymerization*. Eur J Biochem, 2001. **268**(7): p. 2083-90.
71. Wettstein, G., Bellaye, P.S., Micheau, O., and Bonniaud, P., *Small heat shock proteins and the cytoskeleton: an essential interplay for cell integrity?* Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(10): p. 1680-6.
72. Benndorf, R., Hayess, K., Ryazantsev, S., Wieske, M., Behlke, J., and Lutsch, G., *Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity*. J Biol Chem, 1994. **269**(32): p. 20780-4.
73. Seit-Nebi, A.S., Datskevich, P., and Gusev, N.B., *Commentary on paper: Small heat shock proteins and the cytoskeleton: an essential interplay for cell integrity? (Wettstein et al.)*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(2): p. 344-6.
74. Pivovarova, A.V., Chebotareva, N.A., Chernik, I.S., Gusev, N.B., and Levitsky, D.I., *Small heat shock protein Hsp27 prevents heat-induced aggregation of F-actin by forming soluble complexes with denatured actin*. FEBS J, 2007. **274**(22): p. 5937-48.
75. Hino, M., Kurogi, K., Okubo, M.A., Murata-Hori, M., and Hosoya, H., *Small heat shock protein 27 (HSP27) associates with tubulin/microtubules in HeLa cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **271**(1): p. 164-9.
76. Almeida-Souza, L., Asselbergh, B., De Winter, V., Goethals, S., Timmerman, V., and Janssens, S., *HSPB1 facilitates the formation of non-centrosomal microtubules*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66541.
77. Jia, Y., Wu, S.L., Isenberg, J.S., Dai, S., Sipes, J.M., Field, L., Zeng, B., Bandle, R.W., Ridnour, L.A., Wink, D.A., Ramchandran, R., Karger, B.L., and Roberts, D.D., *Thiolutin inhibits endothelial cell adhesion by perturbing Hsp27 interactions with components of the actin and intermediate filament cytoskeleton*. Cell Stress Chaperones, 2010. **15**(2): p. 165-81.
78. Perng, M.D., Cairns, L., van den, I.P., Prescott, A., Hutcheson, A.M., and Quinlan, R.A., *Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and alphaB-crystallin*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt 13): p. 2099-112.
79. Quinlan, R.A., Brenner, M., Goldman, J.E., and Messing, A., *GFAP and its role in Alexander disease*. Exp Cell Res, 2007. **313**(10): p. 2077-87.
80. Elliott, J.L., Der Perng, M., Prescott, A.R., Jansen, K.A., Koenderink, G.H., and Quinlan, R.A., *The specificity of the interaction between alphaB-crystallin and desmin filaments and its impact on filament aggregation and cell viability*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2013. **368**(1617): p. 20120375.
81. Kayser, J., Haslbeck, M., Dempfle, L., Krause, M., Grashoff, C., Buchner, J., Herrmann, H., and Bausch, A.R., *The small heat shock protein Hsp27 affects assembly dynamics and structure of keratin intermediate filament networks*. Biophys J, 2013. **105**(8): p. 1778-85.

82. Havasi, A., Li, Z., Wang, Z., Martin, J.L., Botla, V., Ruchalski, K., Schwartz, J.H., and Borkan, S.C., *Hsp27 inhibits Bax activation and apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism*. J Biol Chem, 2008. **283**(18): p. 12305-13.
83. Arrigo, A.P., Simon, S., Gibert, B., Kretz-Remy, C., Nivon, M., Czekalla, A., Guillet, D., Moulin, M., Diaz-Latoud, C., and Vicart, P., *Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets*. FEBS Lett, 2007. **581**(19): p. 3665-74.
84. Paul, C., Manero, F., Gonin, S., Kretz-Remy, C., Viot, S., and Arrigo, A.P., *Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(3): p. 816-34.
85. Charette, S.J. and Landry, J., *The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2000. **926**: p. 126-31.
86. Nefedova, V.V., Muranova, L.K., Sudnitsyna, M.V., Ryzhavskaya, A.S., and Gusev, N.B., *Small Heat Shock Proteins and Distal Hereditary Neuropathies*. Biochemistry (Mosc.), 2015. **80**(13): p. 1734-47.
87. Benndorf, R., Martin, J.L., Kosakovsky Pond, S.L., and Wertheim, J.O., *Neuropathy- and myopathy-associated mutations in human small heat shock proteins: Characteristics and evolutionary history of the mutation sites*. Mutat Res Rev Mutat Res, 2014. **761**: p. 15-30.
88. Capponi, S., Geuens, T., Geroldi, A., Origone, P., Verdiani, S., Cichero, E., Adriaenssens, E., De Winter, V., Bandettini di Poggio, M., Barberis, M., Chio, A., Fossa, P., Mandich, P., Bellone, E., and Timmerman, V., *Molecular Chaperones in the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis: The Role of HSPB1*. Human Mutation, 2016. **37**(11): p. 1202-1208.
89. Van Damme, P., Robberecht, W., and Van Den Bosch, L., *Modelling amyotrophic lateral sclerosis: progress and possibilities*. Disease Models and Mechanisms, 2017. **10**(5): p. 537-549.
90. Pareyson, D., Scaiola, V., and Laura, M., *Clinical and electrophysiological aspects of Charcot-Marie-Tooth disease*. Neuromolecular Med, 2006. **8**(1-2): p. 3-22.
91. Bucci, C., Bakke, O., and Progida, C., *Charcot-Marie-Tooth disease and intracellular traffic*. Prog Neurobiol, 2012. **99**(3): p. 191-225.
92. Zuchner, S. and Vance, J.M., *Emerging pathways for hereditary axonopathies*. J Mol Med (Berl), 2005. **83**(12): p. 935-43.
93. Heirbaut, M., Beelen, S., Strelkov, S.V., and Weeks, S.D., *Dissecting the functional role of the N-terminal domain of the human small heat shock protein HSPB6*. PLoS ONE, 2014. **9**(8): p. e105892.
94. Muranova, L.K., Weeks, S.D., Strelkov, S.V., and Gusev, N.B., *Characterization of Mutants of Human Small Heat Shock Protein HspB1 Carrying Replacements in the N-Terminal Domain and Associated with Hereditary Motor Neuron Diseases*. PLoS ONE, 2015. **10**(5): p. e0126248.

95. Houlden, H., Laura, M., Wavrant-De Vrieze, F., Blake, J., Wood, N., and Reilly, M.M., *Mutations in the HSP27 (HSPB1) gene cause dominant, recessive, and sporadic distal HMN/CMT type 2*. *Neurology*, 2008. **71**(21): p. 1660-8.
96. James, P.A., Rankin, J., and Talbot, K., *Asymmetrical late onset motor neuropathy associated with a novel mutation in the small heat shock protein HSPB1 (HSP27)*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2008. **79**(4): p. 461-3.
97. Almeida-Souza, L., Goethals, S., de Winter, V., Dierick, I., Gallardo, R., Van Durme, J., Irobi, J., Gettemans, J., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Timmerman, V., and Janssens, S., *Increased monomerization of mutant HSPB1 leads to protein hyperactivity in Charcot-Marie-Tooth neuropathy*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(17): p. 12778-86.
98. Almeida-Souza, L., Asselbergh, B., d'Ydewalle, C., Moonens, K., Goethals, S., de Winter, V., Azmi, A., Irobi, J., Timmermans, J.P., Gevaert, K., Remaut, H., Van Den Bosch, L., Timmerman, V., and Janssens, S., *Small heat-shock protein HSPB1 mutants stabilize microtubules in Charcot-Marie-Tooth neuropathy*. *J Neurosci*, 2011. **31**(43): p. 15320-8.
99. Almeida-Souza, L., Timmerman, V., and Janssens, S., *Microtubule dynamics in the peripheral nervous system: A matter of balance*. *Bioarchitecture*, 2011. **1**(6): p. 267-270.
100. Lin, K.P., Soong, B.W., Yang, C.C., Huang, L.W., Chang, M.H., Lee, I.H., Antonellis, A., and Lee, Y.C., *The mutational spectrum in a cohort of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 among the Han Chinese in Taiwan*. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e29393.
101. Chalova, A.S., Sudnitsyna, M.V., Strelkov, S.V., and Gusev, N.B., *Characterization of human small heat shock protein HspB1 that carries C-terminal domain mutations associated with hereditary motor neuron diseases*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014. **1844**(12): p. 2116-26.
102. Ackerley, S., James, P.A., Kalli, A., French, S., Davies, K.E., and Talbot, K., *A mutation in the small heat-shock protein HSPB1 leading to distal hereditary motor neuronopathy disrupts neurofilament assembly and the axonal transport of specific cellular cargoes*. *Hum Mol Genet*, 2006. **15**(2): p. 347-54.
103. Holmgren, A., Bouhy, D., De Winter, V., Asselbergh, B., Timmermans, J.P., Irobi, J., and Timmerman, V., *Charcot-Marie-Tooth causing HSPB1 mutations increase Cdk5-mediated phosphorylation of neurofilaments*. *Acta Neuropathol*, 2013. **126**(1): p. 93-108.
104. Geuens, T., De Winter, V., Rajan, N., Achsel, T., Mateiu, L., Almeida-Souza, L., Asselbergh, B., Bouhy, D., Auer-Grumbach, M., Bagni, C., and Timmerman, V., *Mutant HSPB1 causes loss of translational repression by binding to PCBP1, an RNA binding protein with a possible role in neurodegenerative disease*. *Acta Neuropathol Commun*, 2017. **5**(1): p. 5.
105. Luigetti, M., Fabrizi, G.M., Madia, F., Ferrarini, M., Conte, A., Del Grande, A., Tasca, G., Tonali, P.A., and Sabatelli, M., *A novel HSPB1 mutation in an Italian patient with CMT2/dHMN phenotype*. *J Neurol Sci*, 2010. **298**(1-2): p. 114-7.

106. Capponi, S., Geroldi, A., Fossa, P., Grandis, M., Ciotti, P., Gulli, R., Schenone, A., Mandich, P., and Bellone, E., *HSPB1 and HSPB8 in inherited neuropathies: study of an Italian cohort of dHMN and CMT2 patients*. J Peripher Nerv Syst, 2011. **16**(4): p. 287-94.
107. Antoniadi, T., Buxton, C., Dennis, G., Forrester, N., Smith, D., Lunt, P., and Burton-Jones, S., *Application of targeted multi-gene panel testing for the diagnosis of inherited peripheral neuropathy provides a high diagnostic yield with unexpected phenotype-genotype variability*. BMC medical genetics, 2015. **16**: p. 84.
108. Scarlato, M., Vigano, F., Carrera, P., Previtali, S.C., and Bolino, A., *A novel heat shock protein 27 homozygous mutation: widening of the continuum between MND/dHMN/CMT2*. Journal of the Peripheral Nervous System, 2015. **20**(4): p. 419-21.
109. Evgrafov, O.V., Mersiyanova, I., Irobi, J., Van Den Bosch, L., Dierick, I., Leung, C.L., Schagina, O., Verpoorten, N., Van Impe, K., Fedotov, V., Dadali, E., Auer-Grumbach, M., Windpassinger, C., Wagner, K., Mitrovic, Z., Hilton-Jones, D., Talbot, K., Martin, J.J., Vasserman, N., Tverskaya, S., Polyakov, A., Liem, R.K., Gettemans, J., Robberecht, W., De Jonghe, P., and Timmerman, V., *Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy*. Nat Genet, 2004. **36**(6): p. 602-6.
110. Benedetti, S., Previtali, S.C., Coviello, S., Scarlato, M., Cerri, F., Di Pierri, E., Piantoni, L., Spiga, I., Fazio, R., Riva, N., Natali Sora, M.G., Dacci, P., Malaguti, M.C., Munerati, E., Grimaldi, L.M., Marrosu, M.G., De Pellegrin, M., Ferrari, M., Comi, G., Quattrini, A., and Bolino, A., *Analyzing histopathological features of rare charcot-marie-tooth neuropathies to unravel their pathogenesis*. Arch Neurol, 2010. **67**(12): p. 1498-505.
111. Ylikallio, E., Konovalova, S., Dhungana, Y., Hilander, T., Junna, N., Partanen, J.V., Toppila, J.P., Auranen, M., and Tyynismaa, H., *Truncated HSPB1 causes axonal neuropathy and impairs tolerance to unfolded protein stress*. BBA Clin, 2015. **3**: p. 233-42.
112. Ylikallio, E., Johari, M., Konovalova, S., Moilanen, J.S., Kiuru-Enari, S., Auranen, M., Pajunen, L., and Tyynismaa, H., *Targeted next-generation sequencing reveals further genetic heterogeneity in axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathy and a mutation in HSPB1*. European Journal of Human Genetics, 2014. **22**(4): p. 522-7.
113. Rossor, A.M., Morrow, J.M., Polke, J.M., Murphy, S.M., Houlden, H., Laura, M., Manji, H., Blake, J., and Reilly, M.M., *Pilot phenotype and natural history study of hereditary neuropathies caused by mutations in the HSPB1 gene*. Neuromuscular Disorders, 2017. **27**(1): p. 50-56.
114. Ikeda, Y., Abe, A., Ishida, C., Takahashi, K., Hayasaka, K., and Yamada, M., *A clinical phenotype of distal hereditary motor neuronopathy type II with a novel HSPB1 mutation*. J Neurol Sci, 2009. **277**(1-2): p. 9-12.
115. Mandich, P., Grandis, M., Varese, A., Geroldi, A., Acquaviva, M., Ciotti, P., Gulli, R., Doria-Lamba, L., Fabrizi, G.M., Giribaldi, G., Pizzuti, A., Schenone, A., and Bellone, E., *Severe neuropathy after diphtheria-tetanus-pertussis vaccination in a child carrying a novel*

- frame-shift mutation in the small heat-shock protein 27 gene*. J Child Neurol, 2010. **25**(1): p. 107-9.
116. Rossor, A.M., Davidson, G.L., Blake, J., Polke, J.M., Murphy, S.M., Houlden, H., Innes, A., Kalmar, B., Greensmith, L., and Reilly, M.M., *A novel p.Glu175X premature stop mutation in the C-terminal end of HSP27 is a cause of CMT2*. J Peripher Nerv Syst, 2012. **17**(2): p. 201-5.
 117. Kijima, K., Numakura, C., Goto, T., Takahashi, T., Otagiri, T., Umetsu, K., and Hayasaka, K., *Small heat shock protein 27 mutation in a Japanese patient with distal hereditary motor neuropathy*. J Hum Genet, 2005. **50**(9): p. 473-6.
 118. Rossor, A.M., Davidson, G.L., Blake, J., Polke, J.M., Murphy, S.M., Houlden, H., Innes, A., Kalmar, B., Greensmith, L., and Reilly, M.M., *A novel p.Gln175X [corrected] premature stop mutation in the C-terminal end of HSP27 is a cause of CMT2*. Journal of the Peripheral Nervous System, 2012. **17**(2): p. 201-5.
 119. De Vos, K.J., Grierson, A.J., Ackerley, S., and Miller, C.C., *Role of axonal transport in neurodegenerative diseases*. Annu Rev Neurosci, 2008. **31**: p. 151-73.
 120. d'Ydewalle, C., Krishnan, J., Chiheb, D.M., Van Damme, P., Irobi, J., Kozikowski, A.P., Vanden Berghe, P., Timmerman, V., Robberecht, W., and Van Den Bosch, L., *HDAC6 inhibitors reverse axonal loss in a mouse model of mutant HSPB1-induced Charcot-Marie-Tooth disease*. Nat Med, 2011. **17**(8): p. 968-74.
 121. d'Ydewalle, C., Benoy, V., and Van Den Bosch, L., *Charcot-Marie-Tooth disease: emerging mechanisms and therapies*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(8): p. 1299-304.
 122. Holzbaur, E.L. and Scherer, S.S., *Microtubules, axonal transport, and neuropathy*. N Engl J Med, 2011. **365**(24): p. 2330-2.
 123. Benoy, V., Vanden Berghe, P., Jarpe, M., Van Damme, P., Robberecht, W., and Van Den Bosch, L., *Development of Improved HDAC6 Inhibitors as Pharmacological Therapy for Axonal Charcot-Marie-Tooth Disease*. Neurotherapeutics, 2017. **14**(2): p. 417-428.
 124. Garnham, C.P. and Roll-Mecak, A., *The chemical complexity of cellular microtubules: tubulin post-translational modification enzymes and their roles in tuning microtubule functions*. Cytoskeleton (Hoboken), 2012. **69**(7): p. 442-63.
 125. Srivastava, A.K., Rensch, S.R., Naiman, N.E., Gu, S., Sneh, A., Arnold, W.D., Sahenk, Z., and Kolb, S.J., *Mutant HSPB1 overexpression in neurons is sufficient to cause age-related motor neuronopathy in mice*. Neurobiol Dis, 2012. **47**(2): p. 163-73.
 126. Minin, A.A. and Moldaver, M.V., *Intermediate vimentin filaments and their role in intracellular organelle distribution*. Biochemistry (Mosc.), 2008. **73**(13): p. 1453-66.
 127. Herrmann, H. and Aebi, U., *Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds*. Annual Review of Biochemistry, 2004. **73**: p. 749-89.
 128. Kornreich, M., Avinery, R., Malka-Gibor, E., Laser-Azogui, A., and Beck, R., *Order and disorder in intermediate filament proteins*. FEBS Letters, 2015. **589**(19 Pt A): p. 2464-76.

129. Strelkov, S.V., Herrmann, H., and Aebi, U., *Molecular architecture of intermediate filaments*. Bioessays, 2003. **25**(3): p. 243-51.
130. Block, J., Schroeder, V., Pawelzyk, P., Willenbacher, N., and Koster, S., *Physical properties of cytoplasmic intermediate filaments*. Biochimica et Biophysica Acta, 2015. **1853**(11 Pt B): p. 3053-64.
131. Herrmann, H., Haner, M., Brettel, M., Ku, N.O., and Aebi, U., *Characterization of distinct early assembly units of different intermediate filament proteins*. Journal of Molecular Biology, 1999. **286**(5): p. 1403-20.
132. Liem, R.K., Yen, S.H., Salomon, G.D., and Shelanski, M.L., *Intermediate filaments in nervous tissues*. Journal of Cell Biology, 1978. **79**(3): p. 637-45.
133. Janmey, P.A., Leterrier, J.-F., and Herrmann, H., *Assembly and structure of neurofilaments*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2003. **8**(1): p. 40-47.
134. Laser-Azogui, A., Kornreich, M., Malka-Gibor, E., and Beck, R., *Neurofilament assembly and function during neuronal development*. Current Opinion in Cell Biology, 2015. **32**: p. 92-101.
135. Veeranna, Amin, N.D., Ahn, N.G., Jaffe, H., Winters, C.A., Grant, P., and Pant, H.C., *Mitogen-activated protein kinases (Erk1,2) phosphorylate Lys-Ser-Pro (KSP) repeats in neurofilament proteins NF-H and NF-M*. Journal of Neuroscience, 1998. **18**(11): p. 4008-21.
136. Elder, G.A., Friedrich, V.L., Jr., Pereira, D., Tu, P.H., Zhang, B., Lee, V.M., and Lazzarini, R.A., *Mice with disrupted mid-sized and heavy neurofilament genes lack axonal neurofilaments but have unaltered numbers of axonal microtubules*. Journal of Neuroscience Research, 1999. **57**(1): p. 23-32.
137. Zhu, Q., Couillard-Despres, S., and Julien, J.P., *Delayed maturation of regenerating myelinated axons in mice lacking neurofilaments*. Experimental Neurology, 1997. **148**(1): p. 299-316.
138. Yates, D.M., Manser, C., De Vos, K.J., Shaw, C.E., McLoughlin, D.M., and Miller, C.C., *Neurofilament subunit (NFL) head domain phosphorylation regulates axonal transport of neurofilaments*. European Journal of Cell Biology, 2009. **88**(4): p. 193-202.
139. Holmgren, A., Bouhy, D., and Timmerman, V., *Neurofilament phosphorylation and their proline-directed kinases in health and disease*. Journal of the Peripheral Nervous System, 2012. **17**(4): p. 365-76.
140. Nixon, R.A. and Sihag, R.K., *Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function*. Trends in Neurosciences, 1991. **14**(11): p. 501-6.
141. Nakamura, Y., Takeda, M., Angelides, K.J., Tanaka, T., Tada, K., and Nishimura, T., *Effect of phosphorylation on 68 KDa neurofilament subunit protein assembly by the cyclic AMP dependent protein kinase in vitro*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1990. **169**(2): p. 744-50.
142. Gonda, Y., Nishizawa, K., Ando, S., Kitamura, S., Minoura, Y., Nishi, Y., and Inagaki, M., *Involvement of protein kinase C in the regulation of assembly-disassembly of neurofilaments in vitro*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1990. **167**(3): p. 1316-25.

143. Cleverley, K.E., Betts, J.C., Blackstock, W.P., Gallo, J.M., and Anderton, B.H., *Identification of novel in vitro PKA phosphorylation sites on the low and middle molecular mass neurofilament subunits by mass spectrometry*. Biochemistry, 1998. **37**(11): p. 3917-30.
144. Yuan, A., Rao, M.V., Veeranna, and Nixon, R.A., *Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2017. **9**(4).
145. Houlden, H. and Reilly, M.M., *Molecular genetics of autosomal-dominant demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease*. Neuromolecular Med, 2006. **8**(1-2): p. 43-62.
146. Chung, C.T., Niemela, S.L., and Miller, R.H., *One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989. **86**(7): p. 2172-5.
147. Birnboim, H.C. and Doly, J., *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic acids research, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
148. Mymrikov, E.V., Bukach, O.V., Seit-Nebi, A.S., and Gusev, N.B., *The pivotal role of the beta 7 strand in the intersubunit contacts of different human small heat shock proteins*. Cell Stress Chaperones, 2010. **15**(4): p. 365-77.
149. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**: p. 248-54.
150. Bushueva, T.L., Busel, E.P., and Burstein, E.A., *Relationship of thermal quenching of protein fluorescence to intramolecular structural mobility*. Biochimica et Biophysica Acta, 1978. **534**(1): p. 141-52.
151. Weast, R., *Handbook of chemistry and physics, 57th edition* 1976-1977: CRC Press Cleveland.
152. Lebowitz, J., Lewis, M.S., and Schuck, P., *Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review*. Protein science : a publication of the Protein Society, 2002. **11**(9): p. 2067-79.
153. Perrie, W.T. and Perry, S.V., *An electrophoretic study of the low-molecular-weight components of myosin*. Biochemical Journal, 1970. **119**(1): p. 31-8.
154. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
155. Nevzorov, I.A., Nikolaeva, O.P., Kainov, Y.A., Redwood, C.S., and Levitsky, D.I., *Conserved noncanonical residue Gly-126 confers instability to the middle part of the tropomyosin molecule*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(18): p. 15766-72.
156. Baranova, E.V., Beelen, S., Gusev, N.B., and Strelkov, S.V., *The taming of small heat-shock proteins: crystallization of the alpha-crystallin domain from human Hsp27*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2009. **65**(Pt 12): p. 1277-81.
157. Пермяков, Е.А., *Метод собственной люминесценции белка* 2003, Москва: Наука.

158. Burstein, E.A., Vedenkina, N.S., and Ivkova, M.N., *Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules*. Photochemistry and Photobiology, 1973. **18**(4): p. 263-79.
159. Kumar, L.V., Ramakrishna, T., and Rao, C.M., *Structural and functional consequences of the mutation of a conserved arginine residue in alphaA and alphaB crystallins*. J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 24137-41.
160. Chalova, A.S., Sudnitsyna, M.V., Semenyuk, P.I., Orlov, V.N., and Gusev, N.B., *Effect of disulfide crosslinking on thermal transitions and chaperone-like activity of human small heat shock protein HspB1*. Cell Stress and Chaperones, 2014. **19**(6): p. 963-72.
161. Das, K.P. and Surewicz, W.K., *Temperature-induced exposure of hydrophobic surfaces and its effect on the chaperone activity of alpha-crystallin*. FEBS Lett, 1995. **369**(2-3): p. 321-5.
162. Chebotareva, N.A., Kurganov, B.I., and Livanova, N.B., *Biochemical effects of molecular crowding*. Biochemistry (Mosc.), 2004. **69**(11): p. 1239-51.
163. Heirbaut, M., Lermyte, F., Martin, E.M., Beelen, S., Sobott, F., Strelkov, S.V., and Weeks, S.D., *Specific Sequences in the N-terminal Domain of Human Small Heat Shock Protein HSPB6 Dictate Preferential Heterooligomerization with the Orthologue HSPB1*. Journal of Biological Chemistry, 2017.
164. Bumagina, Z., Gurvits, B., Artemova, N., Muranov, K., and Kurganov, B., *Paradoxical acceleration of dithiothreitol-induced aggregation of insulin in the presence of a chaperone*. Int J Mol Sci, 2010. **11**(11): p. 4556-79.
165. Perng, M.D., Huang, Y.S., and Quinlan, R.A., *Purification of Protein Chaperones and Their Functional Assays with Intermediate Filaments*. Methods in Enzymology, 2016. **569**: p. 155-75.
166. Heins, S., Wong, P.C., Muller, S., Goldie, K., Cleveland, D.W., and Aeby, U., *The rod domain of NF-L determines neurofilament architecture, whereas the end domains specify filament assembly and network formation*. Journal of Cell Biology, 1993. **123**(6 Pt 1): p. 1517-33.
167. Sharma, S., Conover, G.M., Elliott, J.L., Der Perng, M., Herrmann, H., and Quinlan, R.A., *alphaB-crystallin is a sensor for assembly intermediates and for the subunit topology of desmin intermediate filaments*. Cell Stress and Chaperones, 2017. **22**(4): p. 613-626.
168. Beck, R., Deek, J., and Safinya, C.R., *Structures and interactions in 'bottlebrush' neurofilaments: the role of charged disordered proteins in forming hydrogel networks*. Biochemical Society Transactions, 2012. **40**(5): p. 1027-31.
169. Sokolova, A.V., Kreplak, L., Wedig, T., Mucke, N., Svergun, D.I., Herrmann, H., Aeby, U., and Strelkov, S.V., *Monitoring intermediate filament assembly by small-angle x-ray scattering reveals the molecular architecture of assembly intermediates*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(44): p. 16206-11.
170. Lelj-Garolla, B. and Mauk, A.G., *Self-association and chaperone activity of Hsp27 are thermally activated*. J Biol Chem, 2006. **281**(12): p. 8169-74.

171. Ip, W. and Fellows, M.E., *Fluorescent measurement of desmin intermediate filament assembly*. Analytical Biochemistry, 1990. **185**(1): p. 10-6.
172. Панасенко, О.О., Ким, М.В., and Гусев, Н.Б., *Структура и свойства малых белков теплового шока*. Успехи биологической химии, 2003. **43**: p. 59-98.
173. Sun, X., Fontaine, J.M., Rest, J.S., Shelden, E.A., Welsh, M.J., and Benndorf, R., *Interaction of human HSP22 (HSPB8) with other small heat shock proteins*. J Biol Chem, 2004. **279**(4): p. 2394-402.
174. Chavez Zobel, A.T., Lambert, H., Theriault, J.R., and Landry, J., *Structural instability caused by a mutation at a conserved arginine in the alpha-crystallin domain of Chinese hamster heat shock protein 27*. Cell Stress Chaperones, 2005. **10**(2): p. 157-66.
175. Michiel, M., Skouri-Panet, F., Duprat, E., Simon, S., Ferard, C., Tardieu, A., and Finet, S., *Abnormal assemblies and subunit exchange of alphaB-crystallin R120 mutants could be associated with destabilization of the dimeric substructure*. Biochemistry, 2009. **48**(2): p. 442-53.
176. Ghosh, J.G., Houck, S.A., and Clark, J.I., *Interactive sequences in the stress protein and molecular chaperone human alphaB crystallin recognize and modulate the assembly of filaments*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(10): p. 1804-15.
177. Houck, S.A., Landsbury, A., Clark, J.I., and Quinlan, R.A., *Multiple sites in alphaB-crystallin modulate its interactions with desmin filaments assembled in vitro*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e25859.
178. Simon, S., Michiel, M., Skouri-Panet, F., Lechaire, J.P., Vicart, P., and Tardieu, A., *Residue R120 is essential for the quaternary structure and functional integrity of human alphaB-crystallin*. Biochemistry, 2007. **46**(33): p. 9605-14.
179. Bera, S., Thampi, P., Cho, W.J., and Abraham, E.C., *A positive charge preservation at position 116 of alpha A-crystallin is critical for its structural and functional integrity*. Biochemistry, 2002. **41**(41): p. 12421-6.
180. Kim, M.V., Kasakov, A.S., Seit-Nebi, A.S., Marston, S.B., and Gusev, N.B., *Structure and properties of K141E mutant of small heat shock protein HSP22 (HspB8, H11) that is expressed in human neuromuscular disorders*. Arch Biochem Biophys, 2006. **454**(1): p. 32-41.

Благодарности

Выражаю глубокую благодарность к.б.н. М.В. Судницыной и к.б.н. П.Н. Дацкевичу за помощь в практической работе, ценные советы и поддержку. Я благодарю сотрудника НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского П.В. Калмыкова за проведение опытов по ультрацентрифугированию, к.б.н. Ф.Н. Розова (компания «Биалекса») за всестороннюю помощь в планировании и проведении экспериментов с культурами клеток, д.б.н., профессора РАН О.С. Соколову (Кафедра Биотехнологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова) за помощь в проведении экспериментов по электронной микроскопии, и к.х.н. М.В. Серебрякову (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского) за проведение экспериментов по масс-спектрометрии.