

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А.Н. БАХА

На правах рукописи

Случанко Николай Николаевич

**Молекулярные основы функционирования
белков семейства 14-3-3**

Специальность: 03.01.04 Биохимия

диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант
член-корреспондент РАН
профессор, д.б.н. Гусев Николай Борисович

Москва – 2020

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	- 6 -
ВВЕДЕНИЕ	- 9 -
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	- 15 -
Роль белковых модулей, структурной разупорядоченности и посттрансляционных модификаций в белок-белковых взаимодействиях	- 15 -
История исследования белков 14-3-3	- 18 -
Изоформы и филогения белков 14-3-3	- 19 -
Распространение 14-3-3 в тканях человека.....	- 21 -
Пространственная структура белков 14-3-3	- 23 -
Взаимодействие 14-3-3 с фосфопептидами	- 27 -
Особенности взаимодействия 14-3-3 с белками-партнерами	- 30 -
Многофункциональность белков 14-3-3	- 35 -
Регуляция функционирования белков 14-3-3	- 39 -
Интерактом белков 14-3-3	- 41 -
Малый белок теплового шока HSPB6 – важный партнер белков 14-3-3.....	- 48 -
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	- 56 -
2.1. МАТЕРИАЛЫ.....	- 56 -
2.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	- 63 -
2.2.1. Клонирование и сайт-направленный мутагенез	- 63 -
2.2.2. Трансформация клеток плазмидной ДНК.....	- 66 -
2.2.3. Экспрессия и ко-экспрессия белков в клетках E.coli.....	- 66 -
2.2.4. Выделение и очистка рекомбинантных белков	- 67 -
2.2.5. Фосфорилирование и дефосфорилирование белков in vitro	- 70 -
2.2.6. Спектроскопия кругового дихроизма.....	- 71 -
2.2.7. Флуоресцентная спектроскопия.....	- 73 -
2.2.7.1. Измерение собственной флуоресценции белков.....	- 73 -
2.2.7.2. Исследование гидрофобности белков при связывании флуоресцентного зонда бис-АНС	- 73 -
2.2.7.3. Взаимодействие белков 14-3-3 с AEDANS-меченым HSPB6.....	- 74 -
2.2.7.4. Исследование взаимодействия белков с пептидами с помощью метода поляризации флуоресценции.....	- 75 -
2.2.8. Изотермическая титрационная калориметрия	- 76 -
2.2.9. Аналитическая гель-фильтрация с многопараметрической детекцией	- 77 -

2.2.10. Седиментационный анализ	- 78 -
2.2.11. Ограниченный протеолиз	- 79 -
2.2.12. Исследование термостабильности белков	- 81 -
2.2.12.1. Зависимость триптофановой флуоресценции от температуры.....	- 81 -
2.2.12.2. Изменение вторичной структуры белков при нагревании	- 82 -
2.2.12.3. Дифференциальная сканирующая калориметрия	- 83 -
2.2.13. Химическое «сшивание» белков глутаровым альдегидом.....	- 84 -
2.2.14. Шапероно-подобная активность	- 84 -
2.2.14.1. ДТТ-индуцированная агрегация лизоцима и инсулина.....	- 85 -
2.2.14.2. Индуцируемая повышением температуры агрегация дрожжевой алкогольдегидрогеназы в присутствии ЭДТА.....	- 86 -
2.2.14.3. Индуцируемая повышением температуры агрегация киназы гликогенфосфорилазы в присутствии двухвалентных катионов.....	- 87 -
2.2.14.4. Индуцируемая повышением температуры агрегация субфрагмента 1 миозина	- 87 -
2.2.15. Структурные методы исследования	- 88 -
2.2.15.1. Рентгеноструктурный анализ	- 88 -
2.2.15.2. Малоугловое рассеяние рентгеновских лучей.....	- 95 -
2.2.15.3. Предсказание склонности белков к структурной разупорядоченности....	- 101 -
2.2.16. Другие аналитические методы	- 102 -
2.2.16.1. Спектрофотометрическое определение концентрации белка	- 102 -
2.2.16.2. ДСН-электрофорез по методу Лэммли.....	- 102 -
2.2.16.3. Градиентный ДСН-электрофорез.....	- 103 -
2.2.16.4. Изоэлектрофокусирование	- 104 -
2.2.16.5. Электрофорез белков в нативных условиях	- 104 -
2.2.16.6. Авторадиография.....	- 105 -
2.2.16.7. Масс-спектрометрия.....	- 105 -
2.2.16.8. Некоторые биоинформатические методы	- 106 -
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	- 107 -
3.1. Молекулярный механизм взаимодействия 14-3-3 с малым белком теплового шока HSPB6	- 107 -
3.1.1. Олигомерное состояние белков 14-3-3 и HSPB6.....	- 107 -
3.1.2. Эффект фосфата на взаимодействие белков 14-3-3 и HSPB6.....	- 117 -
3.1.3. Взаимодействие фосфопептидов HSPB6 с белками 14-3-3.....	- 122 -

3.1.4. Взаимодействие полноразмерного HSPB6 с белками 14-3-3.....	- 126 -
3.1.5. Кристаллическая структура полноразмерного комплекса 14-3-3 и HSPB6	- 129 -
3.1.6. Анализ структуры комплекса белков 14-3-3 и HSPB6 в растворе.....	- 137 -
3.1.7. Этапы сборки комплекса 14-3-3/HSPB6 и возможности для создания лекарственных препаратов, влияющих на эти процессы	- 142 -
3.2. Разработка и применение методов, облегчающих структурные исследования комплексов 14-3-3	- 147 -
3.2.1. Получение фосфорилированных белков при ко-экспрессии с РКА	- 147 -
3.2.1.1. Подбор компонентов системы ко-экспрессии на примере белка Tau	- 148 -
3.2.1.2. Двойная ко-экспрессия Tau с РКА	- 152 -
3.2.1.3. Тройная ко-экспрессия Tau с РКА и 14-3-3.....	- 157 -
3.2.1.4. Применение системы ко-экспрессии для получения фосфорилированного белка STARD1.....	- 160 -
3.2.2. Химерные конструкции на основе белков 14-3-3	- 162 -
3.2.2.1. Дизайн химерных конструкций 14-3-3 с пептидами белков-партнеров для структурных исследований.....	- 162 -
3.2.2.2. Кристаллическая структура прототипной химеры 14-3-3 σ с фосфопептидом белка HSPB6.....	- 167 -
3.2.2.3. Кристаллические структуры химер 14-3-3 σ с фосфопептидами белков Gli1-3, AANAT и STARD1	- 170 -
3.2.2.4. Преимущества и недостатки химер на основе 14-3-3 σ	- 178 -
3.2.2.5. Химерная конструкция 14-3-3 ζ с фосфопептидом проапоптотического белка BAD человека.....	- 182 -
3.2.2.6. Исследование механизма взаимодействия 14-3-3 ζ с фосфопептидами онкобелка E6 вируса папилломы человека с применением химерных конструкций	- 186 -
3.2.2.7. Дизайн и применение химерной конструкции 14-3-3 σ с фосфорилированным белком HSPB6 для структурных исследований	- 207 -
3.3. Мономеризация и шапероно-подобная активность 14-3-3.....	- 219 -
3.3.1. Получение и характеристика мономерной мутантной формы 14-3-3 ζ	- 219 -
3.3.2. Взаимодействие мономерной мутантной формы 14-3-3 ζ с фосфорилированными белками-партнерами.....	- 227 -
3.3.3. Стабилизация мономерной мутантной формы 14-3-3 ζ при взаимодействии с фосфорилированным HSPB6.....	- 231 -
3.3.4. Фосфорилирование мономерной мутантной формы 14-3-3 ζ и его эффект на взаимодействие 14-3-3 с белком-партнером.....	- 234 -

3.3.5. Склонность к разупорядоченности структуры, скрытая в N-конце белков 14-3-3.... -	239 -
3.3.6. Структурная конформация мономерной формы 14-3-3 ζ в растворе..... -	244 -
3.3.7. Шапероно-подобная активность димерных и мономерных форм 14-3-3 ζ -	254 -
ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... -	266 -
ВЫВОДЫ..... -	268 -
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... -	273 -

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АА – акриламид
АБ – амфипатическая бороздка
АДГ – алкогольдегидрогеназа
АТФ – аденозинтрифосфат
АУЦ – аналитическое ультрацентрифугирование
ББВ – белок-белковые взаимодействия
бис-АНС – бис-1,8-анилинонафталинсульфонат
БСА – бычий сывороточный альбумин
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ГА – глутаровый альдегид
ГФ – гель-фильтрация
ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия
ДСН – додецилсульфат натрия;
ДСР – динамическое светорассеяние
ДТТ – дитиотрейтол
ИПТГ – изопротил β-тиогалактозид
ИТК – изотермическая титрационная калориметрия
КД – круговой дихроизм
кДНК – кодирующая ДНК
МБА – метилен бисакриламид
мРНК – матричная РНК
МУРР – малоугловое рассеяние рентгена
МЭ – β-меркаптоэтанол
ПААГ – полиакриламидный гель
ПСА – персульфат аммония
ПЭГ – полиэтиленгликоль
РСА – рентгеноструктурный анализ
ТЕМЕД – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин
ТМАО – триметил-N-оксид
Трис – Трис-гидроксиметиламинометан
УФ – ультрафиолет
ФМСФ – фенилметилсульфонилфторид
цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
ЯМР – ядерный магнитный резонанс
- AAAT – aralkylamine N-acetyltransferase
AEDANS – 5-[2-(iodoacetamido)ethylamino]naphthalene-1-sulfonic acid
ASK1 – apoptosis signal-regulating kinase 1
ATM/ATR – ataxia telangiectasia mutated (ATM)/ATM and RAD3-related (ATR) kinases
BAD – Bcl2-associated agonist of cell death

BAX – Bcl-2-associated X protein
BRCT – C-terminal domain of the breast cancer susceptibility protein 1 (BRCA1)
CAMK – Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase
ChK1 – checkpoint kinase 1
Fc – fusicoccin
FF – phosphoserine-binding protein domain containing two conserved Phe residues
FHA – forkhead-associated domain
FOXO – forkhead box protein O
FRET – Förster resonance energy transfer
Gli – glioma-associated oncogene
HDAC4 – histone deacetylase 4
HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPV – human papilloma virus
HSP – heat shock proteins
IDP – intrinsically disordered protein
IDR – intrinsically disordered regions
IMAC – immobilized metal affinity chromatography
IRF3 – interferon regulatory factor 3
JNK – c-Jun N-terminal kinase
LB – Luria-Bertani medium
MALLS – multiangle laser light scattering
MAPK – mitogen-activated protein kinase
MAPKAPK – mitogen-activated protein kinase activated protein kinase
MARK – microtubule affinity regulating kinase
MBP – maltose-binding protein
MEK – mitogen-activated protein kinase kinase, MAP kinase/ERK kinase
MES – 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MH2 – Mad Homology domain 2
MPD – 2-Methyl-2,4-pentanediol
NTD – N-terminal domain
PAK6 – P21 (RAC1) Activated Kinase 6
PBD – polo-box domain
PBM – PDZ domain binding motifs
PDB – protein data bank
PDZ – Post synaptic density (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1) и zonula occludens-1 (zo-1) protein domain
PKA – cAMP dependent protein kinase
PKC – protein kinase C
PMA2 – plasma membrane ATPase 2
PTB – phosphotyrosine-binding domain
r.m.s.d. – root mean square deviation
ROCK – Rho-dependent protein kinase
RSK1 – ribosomal s6 kinase 1
SDK1 – Sphingosine-dependent protein kinase-1 (caspase cleavage product of PKC δ)

STARD1 – steroidogenic acute regulatory protein 1 (=StAR)
SUMO – small ubiquitin-like modifier
sHSP – small heat shock proteins
SH2 – Src homology region domain 2
TCEP – tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEV – tobacco etch virus
TLCK – tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride
TLS – translation, libration, screw
TPCK – tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone
TPR – Tetratrico Peptide Repeat
TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethane
WD40 – protein domains containing characteristic WD dipeptides
WT – wild type
WW – protein domain containing two conserved Trp residues

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Проблемы узнавания крайне важны в биологии. Актуальны они и для таких систем как белок-белковые взаимодействия (ББВ), которые лежат в основе подавляющего числа жизненно-важных процессов на молекулярном уровне. Нормальное функционирование живой клетки сложно себе представить без скоординированной и лабильной системы взаимодействий с участием белков. Определение прочности, селективности и *механизма* конкретных ББВ составляет одну из ключевых задач современной биохимии и молекулярной биологии. Решение этой важной фундаментальной задачи также позволяет получать знания, необходимые для разработки лекарственных препаратов для людей с различными патологиями, а потому имеет чрезвычайную актуальность.

Крайне важным свойством многих ББВ является их *регулируемость*, за счет чего белковые комплексы возникают только в ответ на определенный сигнал и контролируемо диссоциируют, будучи не востребуемыми. Одним из эффективных механизмов регуляции ББВ является *фосфорилирование* – катализируемый ферментами-протеинкиназами перенос фосфатной группы с молекулы АТФ на определенные остатки в составе белка-мишени, в результате чего меняются его свойства и узнаваемость другими белками. Активность фосфатаз за счет *дефосфорилирования* обеспечивает обратимость регуляции.

Белки семейства 14-3-3 широко распространены у эукариот и являются универсальными белками-регуляторами, которые селективно узнают белки-партнеры, фосфорилированные по остаткам серина или треонина в определенных последовательностях. Фосфопептид-связывающая функция 14-3-3 основана на их димерной структуре, однако фосфорилирование самих 14-3-3 также может регулировать их олигомерное состояние и функции. Связываясь с фосфорилированными белками-партнерами и влияя на их ферментативную активность, внутриклеточную локализацию, или взаимодействие с другими белками, 14-3-3 участвуют в регуляции апоптоза, клеточного деления, функционирования транскрипционных факторов, продукции гормонов и т.д. [1]. Недавно была описана *шапероно-подобная* функция 14-3-3, которая заключается в предотвращении агрегации других белков, что актуально при развитии так называемых «конформационных» болезней, включая болезни Альцгеймера и Паркинсона [2]. В связи с полифункциональностью, 14-3-3 и их комплексы являются потенциальной мишенью для разработки лекарств при ряде серьезных патологий, включая нарушения работы гладкой мускулатуры, муковисцидоз, а также нейродегенеративные и онкологические заболевания [3].

Ключом к коррекции этих патологий может стать определение молекулярных механизмов образования и пространственных структур комплексов с участием 14-3-3. Однако среди сотен экспериментально подтвержденных, физиологически значимых взаимодействий с участием 14-3-3 комплексы с установленной структурой исчисляются единицами. Структурные исследования серьезно осложняются необходимостью получения стехиометрически фосфорилированных белков-партнеров 14-3-3 и наличием в них протяженных разупорядоченных участков. Несмотря на долгую историю с момента открытия белков 14-3-3, многие аспекты их функционирования остаются исследованными лишь поверхностно.

Цель работы и основные задачи исследования

Целью работы стало исследование молекулярных механизмов взаимодействия белков 14-3-3 с фосфорилированными белками-партнерами, а также изучение процессов димеризации 14-3-3 и их шапероно-подобной активности. Для достижения цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Определение молекулярного механизма взаимодействия 14-3-3 с малым белком теплового шока HSPB6 человека, участвующим в регуляции расслабления гладких мышц, и выявление факторов, влияющих на прочность этого взаимодействия.
2. Установление трехмерной структуры комплекса 14-3-3 с фосфопептидами и полноразмерным фосфорилированным HSPB6.
3. Разработка и применение подходов, облегчающих получение фосфорилированных белков-партнеров и структурные исследования их комплексов с 14-3-3.
4. Получение мономерной формы белка 14-3-3, исследование ее структуры и физико-химических свойств, в сравнении с димерным белком дикого типа.
5. Локализация областей 14-3-3, участвующих в его антиагрегационной (шапероно-подобной) активности.

Объекты и методы исследования

Все белки, используемые в работе, были получены при суперэкспрессии в клетках *Escherichia coli* и очищены с помощью комбинации хроматографических методов. Работа выполнена с привлечением методов *молекулярной биологии* (клонирование, сайт-направленный мутагенез), *микробиологии* (культивирование прокариотических микроорганизмов), *биохимии* (различные виды гель-электрофореза и хроматографии, энзиматическая модификация рекомбинантных белков – фосфорилирование, дефосфорилирование и ограниченный протеолиз), *биофизики* (абсорбционная и

флуоресцентная спектроскопия, поляризация флуоресценции, круговой дихроизм, динамическое светорассеяние, аналитическое ультрацентрифугирование, дифференциальная сканирующая калориметрия и изотермическая калориметрия титрования), а также *структурной биологии* (малоугловое рассеяние рентгеновских лучей, монокристаллическая рентгеновская кристаллография).

Основные положения, выносимые на защиту

1. В условиях краудинга, свойственного для цитоплазмы живой клетки, димеры HSPB6 проявляют склонность к самоассоциации, типичной для малых белков теплового шока. Самоассоциации HSPB6 препятствует его фосфорилирование по остатку Ser16 в N-концевом неструктурированном сегменте.
2. Димер HSPB6, фосфорилированный по Ser16, способен взаимодействовать с димерами 14-3-3 за счет связывания фосфорилированной последовательности RRApS¹⁶APLP HSPB6 в амфипатической бороздке (АБ) 14-3-3 (микромольная константа диссоциации) при общей стехиометрии связывания 2:2.
3. Неорганический фосфат и глицерофосфаты в миллимолярных концентрациях ингибируют взаимодействие 14-3-3 с фосфорилированным HSPB6 за счет конкуренции за связывание в АБ 14-3-3, причем этот эффект зависит от концентрации анионов. Пирофосфат и сульфат оказывают значительно меньший ингибирующий эффект.
4. Кристаллическая структура комплекса 14-3-3 с фосфорилированным HSPB6, полученная с разрешением 4,5 Å и подтвержденная с помощью структур пептидных комплексов, выявляет структурирование N-концевого сегмента HSPB6 при взаимодействии с 14-3-3. Области контакта белков потенциально применимы для разработки фармакологических соединений (например, миорелаксантов).
5. Ко-экспрессия целевых белков с протеинкиназой А (РКА) в клетках *E.coli* позволяет получать образцы, фосфорилированные по участкам, узнаваемым белками 14-3-3, а наличие отщепляемых аффинных тагов облегчает очистку. В некоторых случаях, ко-экспрессия одновременно с РКА и 14-3-3 обеспечивает получение комплекса 14-3-3 с фосфорилированным белком-партнером (показано для Тау белка).
6. Химерные конструкции, состоящие из 14-3-3 и фосфорилируемых фрагментов нескольких белков-партнеров и ко-экспрессированные с РКА, облегчают получение комплексов с фиксированной стехиометрией, которые легко кристаллизуются и дают

структурную информацию о конформации связанного фосфопептида, эквивалентную более трудоемкому и дорогому использованию синтетических фосфопептидов.

7. Мономерная форма 14-3-3, полученная с помощью инженерии димерного интерфейса, показывает сниженную по сравнению с димерным белком термостабильность и устойчивость к протеолизу, но обладает повышенной поверхностной гидрофобностью и шапероно-подобной активностью по отношению к нескольким белкам-субстратам.
8. Мономеризация способствует структурной разупорядоченности N-концевого сегмента 14-3-3, который может быть важен для димеризации и шапероно-подобной активности.

Научная новизна и практическая значимость работы

Проведено комплексное структурно-функциональное исследование, в результате которого установлен молекулярный механизм взаимодействия 14-3-3 с белком HSPB6, участвующим в регуляции расслабления гладких мышц бронхов и сосудов [4]. Впервые определены пространственные структуры комплекса 14-3-3 с полноразмерным белком HSPB6 и его фрагментами. Это позволило выявить ключевые молекулярные интерфейсы, которые привлекательны с точки зрения подбора низкомолекулярных модуляторов, обладающих терапевтическим потенциалом. На момент публикации в 2017 году, полученная нами структура стала первой структурой какого-либо полноразмерного малого белка теплового шока в функциональном состоянии и одновременно второй структурой белок-белкового комплекса 14-3-3 (после комплекса с AANAT). Вслед за нашей работой в последние годы были определены пространственные структуры сразу нескольких других комплексов 14-3-3. Было разработано несколько подходов для более быстрого и удобного получения фосфорилированных белков и их комплексов 14-3-3, облегчающих структурные исследования, в том числе в высокопоточном формате, который востребован с учетом крайне обширного интерактома белков 14-3-3. Продемонстрирована применимость подхода, основанного на химерах 14-3-3 с фосфопептидами, для решения структур физиологически значимых комплексов, перспективных с точки зрения разработки лекарств, в том числе получены первые структуры комплексов 14-3-3 с фосфорилированными фрагментами стероидогенного регуляторного белка STARD1 и онкобелка E6 вируса папилломы человека. В случае E6 была установлена не только одна из первых структур 14-3-3 с фосфорилированным C-концевым мотивом вида pS/pTXX-COOH, но и показана селективность действия фузикокина – широко известного стабилизатора взаимодействий с

участием 14-3-3, который в случае 14-3-3/Е6 оказывал умеренное ингибирующее действие. С учетом высокого разрешения, эти структурные данные могут помочь в развитии подходов к лечению папилломавирусных инфекций в будущем.

Личный вклад соискателя

Большинство исследований, вошедших в диссертацию, выполнено непосредственно самим соискателем, либо под его руководством. Научная работа соискателя была отмечена Медалью Президиума РАН (2012 г.), Стипендией Президента РФ (2016/2017), Премией правительства Москвы для молодых ученых (2019). Некоторые этапы работы выполнены в сотрудничестве с другими исследователями, однако во всех случаях постановку задач осуществлял соискатель.

Финансовая поддержка

Работа была поддержана программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», Стипендией Президента РФ (СП-367.2016.4), грантами Российского Фонда Фундаментальных Исследований (12-04-31259мол_a, 14-04-00146А, 16-04-00560А) и Российского Научного Фонда (17-74-10053, 16-14-10055, 19-74-10031), а также стипендиями FEBS (2012 г.) и EMBO (2015 г.) для выполнения исследований за рубежом.

Публикация и апробация работы

Основные результаты диссертации опубликованы в виде 20 статей в международных рецензируемых журналах и одной главе в книге, входящих в перечень ВАК. Результаты исследования были представлены в виде стендовых и устных докладов на международных **конгрессах** (FEBS/EMBO в Париже (Франция) в 2014 г., FEBS в Иерусалиме (Израиль) в 2017 г. (включая форум молодых ученых YSF), FEBS в Праге (Чехия) в 2018 г., FEBS в Кракове (Польша) в 2019 г.), **конференциях** (EMBO Conference “The biology of molecular chaperones: From molecules, organelles and cells to misfolding diseases” в Санта-Маргарита ди Пула (Италия) в 2013 г.), **школах** (FEBS “Sofia School for Protein Science: Structure and dynamics of biological macromolecules” в Софии (Болгария) в 2012 г., EMBO Practical Course в Гренобле (Франция) в 2014 г., EMBO Practical Course в Тайпее (Тайвань) в 2015 г., FEBS Practical Course “Advanced Methods in Macromolecular Crystallization VII” в Новые Грады (Чехия) в 2016 г.), а также российских мероприятиях (IV Съезд биофизиков в Нижнем Новгороде в 2012 г., V Съезд биохимиков России в Дагомьсе в 2016 г., VII и VIII Российский

симпозиум «Белки и пептиды» в Новосибирске в 2015 г. и в Москве в 2017 г., VI Молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии в Санкт-Петербурге в 2018 г.), ежегодной конференции ФИЦ Биотехнологии РАН и лектории кафедры биохимии МГУ им. Ломоносова «Ученые о своей работе» (2019 г.). В ходе работы определены 14 новых пространственных структур, координаты атомов и структурные факторы депонированы в Protein Data Bank (коды 5LTW, 5LU1, 5LU2, 5OKF, 5LUM, 5OK9, 5OM0, 5OMA, 6T5F, 6T5H, 6T80, 6TWZ, 6ZFD, 6ZFG).

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация состоит из введения, трех основных глав («Обзор литературы», «Материалы и методы исследования» и «Результаты и обсуждение»), заключения, выводов, приложения и списка литературы, изложена на 336 страницах и содержит 122 рисунка, 30 таблиц и 678 источников литературы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Роль белковых модулей, структурной разупорядоченности и посттрансляционных модификаций в белок-белковых взаимодействиях

Согласно консервативной оценке, в организме человека существуют два-три десятка тысяч белков и гораздо большее число белок-белковых взаимодействий (ББВ, от 300 [5] до 650 тыс. [6]). Такое множество взаимосвязей можно представить в виде сетей, в которых отдельные белки находятся в по-разному соединенных узлах. Оказывается, что некоторые белки могут иметь гораздо больше партнеров, чем другие, что оправдывает название «концентраторов» или «хабов» для этих белков, имеющих много сетевых соединений и, следовательно, повышенную функциональную и эволюционную нагрузку [7-10]. Большое количество связей ставит вопрос о том, какие характеристики белков-хабов позволяют им взаимодействовать с различными белковыми партнерами. Исследования последних двух десятилетий показали, что сети ББВ формируются во многом за счет неструктурированных, или структурно-разупорядоченных, частей белков, которые зачастую опосредуют образование белковых комплексов [7, 9, 11, 12].

Белки, имеющие много партнеров, могут содержать несколько специализированных структурных элементов, которые определяют связывание нескольких разных белков-партнеров одновременно. Действительно, описано много типов уникальных белковых доменов или модулей, таких как SH2, SH3, PH, PDZ, PTB и т.д. [13], которые участвуют в специфическом узнавании, связанном с передачей сигнала, регуляцией транскрипции, поддержанием архитектуры цитоскелета, обеспечением клеточной адгезии и многими другими процессами. Наличие нескольких модулей в многодоменных белках позволяет понять их многофункциональность и широкий круг взаимодействий. Тем не менее, биоинформатический анализ показывает, что сложность существующих сетей ББВ и среднее число возможных партнеров для отдельно взятого белка нельзя полностью объяснить только молекулярными взаимодействиями между различными типами жестких структурных доменов (модулей) [8].

Не имеющие определенной трехмерной структуры внутренне разупорядоченные белки (intrinsically disordered proteins, IDP), в которых хотя бы часть структуры разупорядочена (intrinsically disordered regions, IDR), присутствуют во многих протеомах [14-18]. Склонность к разупорядоченности в белковых последовательностях может достигать 20-30% протеома [19], но плохо коррелирует со сложностью генома [20, 21], указывая на то, что

IDR, как правило, универсально необходимы как для примитивных организмов, так и для высших эукариот. Считается, что механистически IDR дают ряд преимуществ: устраняют стерические затруднения при образовании комплексов с другими белками, обеспечивают гибкое соединение структурированных доменов, облегчают посттрансляционные модификации (ПТМ) и т.д. [10, 22-24]

Оказывается, что белки с большим количеством партнеров довольно активно используют взаимодействия на основе узнавания IDR [7, 9, 10, 25, 26]. Системно-биологический анализ показывает, что количество жестких доменов/модулей в белках-хабах обратно коррелирует с уровнем разупорядоченности в их структурах; то есть, чем меньше структурированных доменов содержится в такой белке, тем большую роль играют IDR в его взаимодействии с различными партнерами [12]. При взаимодействии на основе узнавания IDR широко известен феномен упорядочивания при связывании («folding upon binding») [27, 28], но для многих случаев описано наличие остаточной разупорядоченности даже в составе прочных комплексов, реализованных на основе взаимодействия жесткого домена с IDR [29].

ПТМ могут служить важным молекулярным переключателем, который запускает изменения конформации белков-мишеней и их предпочтений при взаимодействии с другими белками, обеспечивая дополнительные уровни сложности в регуляции и в организации сетей ББВ [30, 31]. ПТМ могут либо аллостерически влиять на свойства конкретного белка-мишени, либо служить химическим сигналом, непосредственно узнаваемым белками-партнерами [30]. Участки ПТМ, особенно фосфорилирования, часто обнаруживаются в IDR [32], что, главным образом, обусловлено субстратными предпочтениями и большей доступностью гибких IDR для соответствующих ферментов-модификаторов.

Существует несколько белковых модулей, которые узнают и непосредственно связывают фосфорилированные аминокислотные остатки – фосфосерин (pSer), фосфотреонин (pThr) и фосфотирозин (pTyr) (Табл. 1) [33]. Известными pSer/pThr-связывающими доменами являются WW, WD40, 14-3-3, BRCT; известные pTyr-связывающие домены – SH2 и РТВ (Табл. 1).

Прекрасной иллюстрацией всех изложенных выше принципов являются белки семейства 14-3-3, которые представляют собой хорошо структурированные белковые модули, взаимодействующие с сотнями различных белковых партнеров за счет узнавания в их неструктурированных областях фосфорилированных остатков серина и/или треонина. Их связывание приводит к упорядочиванию IDR, изменению конформации белка-партнера и регуляции его функции посредством связывания белков 14-3-3.

Табл. 1. Белковые домены (модули), узнающие фосфорилированные остатки.

Имя	Число остатков	Функции	Распространение	Фосф. остаток	Узнаваемый мотив	Ссылки
<i>pSer/pThr связывающие</i>						
14-3-3	~250	Универсальные регуляторы	эукариоты	Ser/Thr	(R/K)X ₂₋₃ (pS/pT)X(P/G); (pS/pT)X ₁₋₂ -COOH	[34, 35]
WW	40	Различные сигнальные процессы	эукариоты	Ser/Thr	(pS/pT)P, может быть в тандеме	[36-38]
WD40	40	Различные сигнальные процессы, белок-белковые и ДНК-белковые взаимодействия, поддержание стабильности генома, клеточный цикл	эукариоты, недавно найдены в прокариотах	Ser/Thr,	Разные, части дегронов, тандемные pSer, нестрогие предпочтения	[39, 40]
FHA	100-120	Транскрипционные факторы и другие регуляторные белки	эубактерии и эукариоты	Thr	pTXXD и pTXXI/L , последовательности сильно отличаются	[41, 42]
BRCT	90-100	Репарация ДНК, точки контроля клеточного цикла	прокариоты и эукариоты	Ser/Thr	pSXXF	[43-45]
FF	~50	Транскрипция и факторы сплайсинга	дрожжи	Ser/Thr?	Отрицательно заряженные мотивы, pSXXpS	[46-48]
MH2 (Smad)	~220	Взаимодействия с рецепторами, активация транскрипции, олигомеризация с другими белками Smad	позвоночные	Ser	SpSXpS -COOH, связаны с гомоолигомеризацией Smad	[49, 50]
Polo-box (PBD)	~80	Клеточный цикл	эукариоты	Ser/Thr	(P/F)PX(T/Q/H/M)S(pT/pS)(P/X)	[51, 52]
IRF3	Множественные домены	Транскрипционная активность, иммунный ответ на вирусные инфекции, топологически и структурно сходные с MH2	эукариоты	Ser	Наиболее вероятно, pSpS , связаны с гомоолигомеризацией IRF3	[53-55]
<i>pTyr связывающие</i>						
SH2	~100	Связывание с активированными рецепторами-Тиркиназами, передача сигнала, могут быть в пределах одного белка	эукариоты	Tyr	pYXX(I/P) , связывание строго с фосфоформами	[56, 57]
PTB	~200		эукариоты	Tyr	NPX pY , возможно связывание с нефосфорилированными формами	[58, 59]

Сокращения и аббревиатуры: FHA, Forkhead-associated domain; PTB, phosphotyrosine-binding domain; SH2, Src homology region domain 2; MH2, Mad Homology domain 2; IRF3, interferon regulatory factor 3; PBD, polo-box domain, уникальный для polo-подобных киназ; FF, домен, содержащий два консервативных остатка фенилаланина; WW, домен с двумя консервативными остатками триптофана; WD40, домены, содержащие характерные дипептиды WD; BRCT, C-концевой домен breast cancer susceptibility protein 1 (BRCA1).

История исследования белков 14-3-3

Первые представители семейства 14-3-3 были обнаружены в 1967 году при классификации белков нервной ткани [60]. Свое название эти белки получили из-за номера фракции при ионообменной хроматографии экстракта мозга быка, в которой они были идентифицированы, и по положению полосы этих белков при последующем геле-электрофорезе. Белки 14-3-3 характеризуются кислой изоэлектрической точкой (4,5-5,0) и небольшой молекулярной массой (~30 кДа).

В 1987 году было обнаружено, что 14-3-3 участвуют в регуляции биосинтеза нейротрансмиттеров за счет активации ключевых ферментов синтеза серотонина и катехоламинов – триптофан- и тирозинмонооксигеназы, соответственно [61]. Образец белка, выделенного из мозга, при фракционировании с помощью обратнофазной жидкостной хроматографии показал наличие девяти пиков, соответствующих разным изоформам 14-3-3, которые были обозначены греческими буквами α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , τ (или θ) и σ [62]. Позднее оказалось, что α представляет собой фосфорированную β изоформу, а δ – фосфорилированную ζ изоформу 14-3-3 [63]. Из-за участия в регуляции синтеза нейротрансмиттеров одним из обозначений для белков 14-3-3, до сих пор используемых во многих базах данных, стала аббревиатура YWHA (tyrosine- (Y) and tryptophan- (W) hydroxylase (H) activators (A)), которую обычно объединяют с первой буквой, обозначающей изоформу, например, YWHAZ или YWHAG (14-3-3 ζ или 14-3-3 γ , соответственно). Помимо этого, за долгую историю исследования представители семейства 14-3-3 получали и другие названия, отражавшие особенности их открытия. Например, *Leonardo* (14-3-3 ϵ дрозофилы), *Bilardo* (14-3-3 ζ дрозофилы), *Stratifin* (14-3-3 σ), *VAP-1* (14-3-3 τ/θ), *CBP* (Cruciform-Binding Protein), *KCIP-1* (protein kinase C inhibitor-1), *Exo1* (стимулятор Ca²⁺-зависимого экзоцитоза), *GF14* (G-box binding factor растений) и т.п. [64].

В 90-х годах XX века было установлено, что 14-3-3 могут подвергаться фосфорилированию [65], регулируют активность протеинкиназ [66] и экспрессируются во многих тканях различных эукариот [67-69], включая дрожжи [69] и растения [68], где они в том числе служат регуляторами нитратредуктазы [70]. В итоге, белки 14-3-3 оказались в центре внимания многих лабораторий, что стимулировало их интенсивное изучение.

В 1995 году была определена трехмерная структура ζ и τ изоформ 14-3-3 млекопитающих [71, 72]. Оказалось, что 14-3-3 существуют в виде димеров, причем мономеры 14-3-3 могут обмениваться с образованием гомо- и гетеродимеров [73]. Вскоре

после установления пространственной структуры, было показано, что 14-3-3 специфически узнают фосфосерин [74], что сделало их первыми описанными белковыми модулями, узнающими фосфорилированные остатки [75].

Десятилетия исследований привели к пониманию того, что 14-3-3 участвуют в регуляции множества клеточных процессов через их прямое взаимодействие с метаболическими ферментами, факторами транскрипции, сигнальными белками, компонентами цитоскелета, белками апоптоза и клеточного цикла, и т.д. [64, 76-81].

Белки 14-3-3 также были найдены в составе амилоидных бляшек у пациентов с болезнью Альцгеймера [82], Паркинсона и другими нейродегенеративными заболеваниями [83-87], наряду с амилоидогенными белками (Тау, α -синуклеин, хантингтин), некоторые из которых способны напрямую взаимодействовать с 14-3-3. Сверхэкспрессия определенных изоформ 14-3-3 обнаружена при различных типах рака, что делает их перспективными маркерами онкологических заболеваний [88-94].

Изоформы и филогения белков 14-3-3

Белки 14-3-3 обнаружены практически во всех исследованных эукариотических организмах, причем, за редким исключением, в каждом организме найдено не менее двух изоформ 14-3-3. Например, у гриба *Candida albicans* и простейшего *Dictyostelium discoideum* обнаружено по одной изоформе 14-3-3. У дрожжей и дрозофилы – по две изоформы. У человека обнаружено 7 изоформ, а у растения *Arabidopsis thaliana* – 15 [95].

Представители семейства 14-3-3 высоко консервативны. Например, гомология 14-3-3 ζ из лягушки *Xenopus tropicalis* и человека составляет около 90%. 14-3-3 ζ человека на 82% совпадает по последовательности с гомологом из тутового шелкопряда *Bombyx mori* и на 81% – с 14-3-3 ζ дрозофилы [96]. 14-3-3 ω из *A.thaliana* и его ближайший гомолог 14-3-3 человека идентичны на 75%. Представители семейства 14-3-3 имеют похожую длину и отличаются, в основном, по структуре коротких вариабельных участков (Рис. 1), хотя они не являются продуктами альтернативного сплайсинга, и каждая изоформа кодируется отдельным геном [95].

Гены различных изоформ 14-3-3, как правило, расположены на разных хромосомах. Так, например, ген 14-3-3 η располагается на 22-ой, а 14-3-3 β – на 20-ой хромосоме человека [97]. Гены σ расположены на 1-ой, τ/θ – на 2-ой, γ – на 7-ой, и ϵ – на 17-ой хромосомах, основной ген, дающий полноценный продукт 14-3-3 ζ , локализован на 8-ой хромосоме [95].

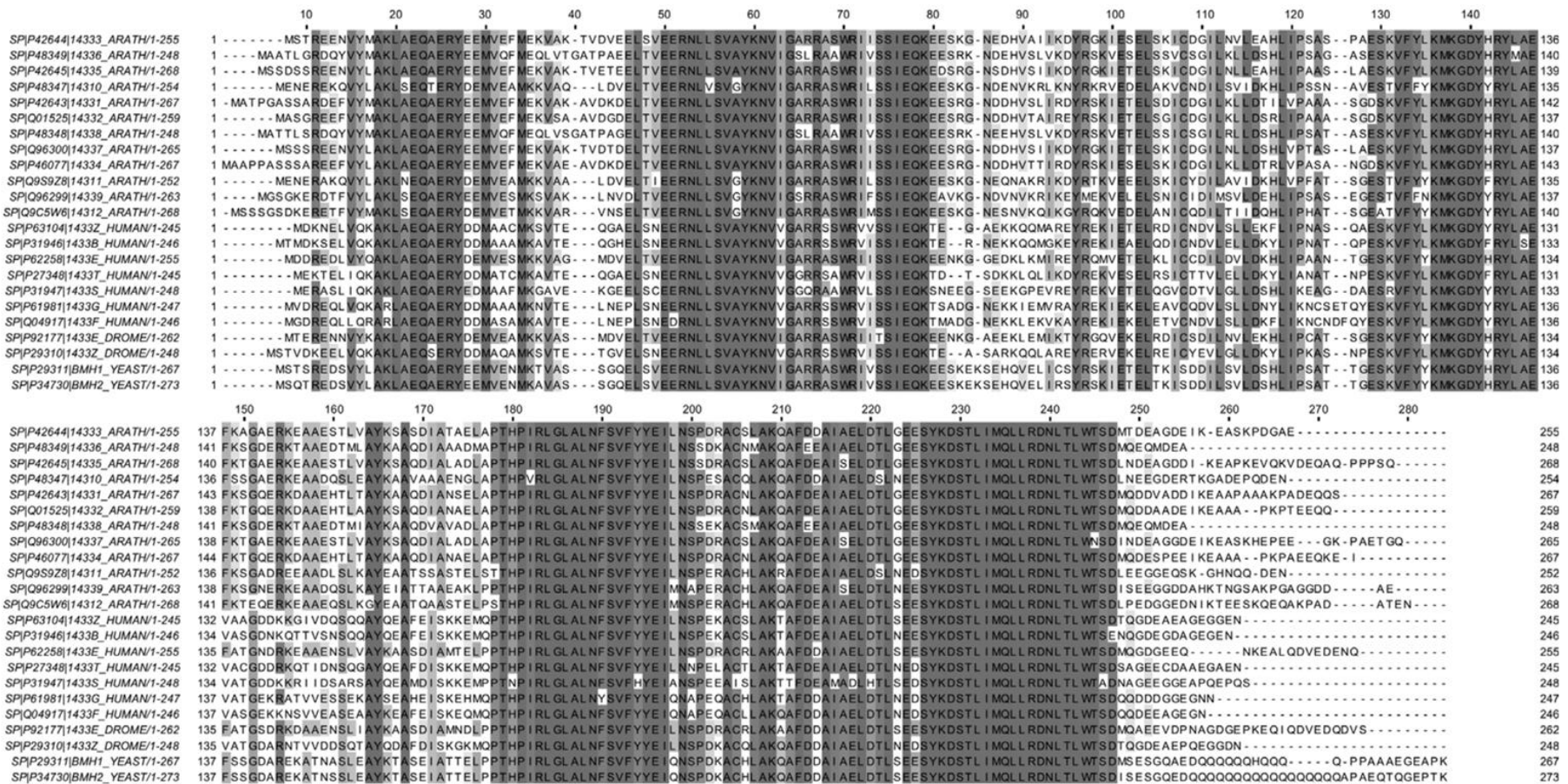


Рис. 1. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей 12 изоформ 14-3-3 растений, 7 изоформ человека, 2 изоформ дрозофилы и 2 изоформ дрожжей (указаны идентификаторы Uniprot). Выравнивание выполнено с помощью *ClustalOmega* [98]. Уровень консервативности показан оттенками серого с шагом 10%. В целом сходные последовательности 14-3-3 существенно различаются в области петель и С-концевого сегмента.

Кроме рабочих генов, в хромосомах человека обнаружено большое число псевдогенов, не участвующих в экспрессии функциональных белков [64]. Так, для ϵ изоформы обнаружены псевдогены, расположенные на 2-ой и 7-ой, а для ζ – на 5-ой, 6-ой, 9-ой, 11-ой и 15-ой хромосомах. Последовательность, соответствующая σ изоформе 14-3-3, также встречается в геноме человека более одного раза [95]. Роль псевдогенов 14-3-3 остается не выясненной.

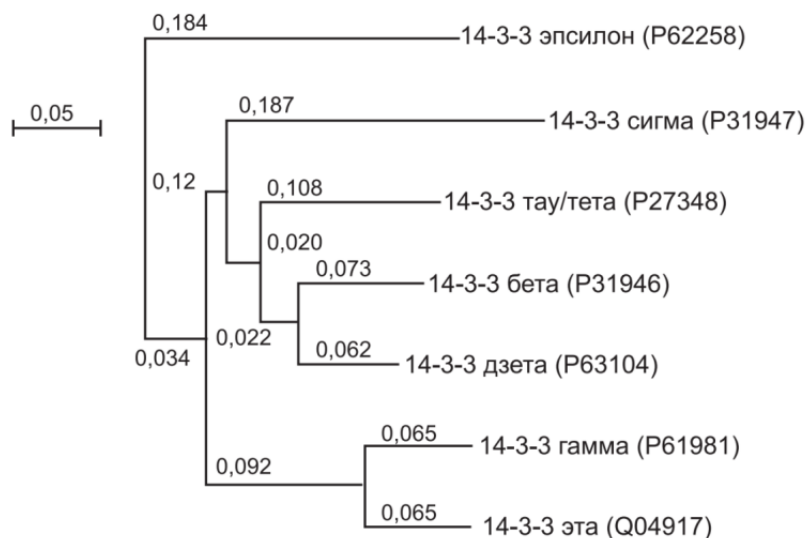


Рис. 2. Филогенетическое древо изоформ 14-3-3 человека. Построено на основе выравнивания, выполненного в *ClustalOmega*. В скобках указаны идентификаторы изоформ в Uniprot. Масштаб 0,05 обозначает число замен в эволюции последовательности предкового полипептида, приходящееся на один аминокислотный остаток.

На Рис. 2 представлено филогенетическое древо, отражающее степень сходства первичных структур различных изоформ 14-3-3 человека. Древо построено в программе *NJplot* [99] на основе множественного выравнивания аминокислотных последовательностей, выполненного с помощью программы *ClustalOmega* [98]. Видно, что попарно наиболее сходны между собой первичные структуры η и γ , β и ζ , а также σ и τ/θ изоформ. Можно предполагать наличие общего предка, давшего начало этим шести изоформам 14-3-3. При этом, ϵ изоформа обособлена от общего ствола $\eta/\gamma/\beta/\zeta/\sigma/\tau$ и, видимо, является наиболее дивергировавшей [100].

Распространение 14-3-3 в тканях человека

В организме человека белки 14-3-3 экспрессируются практически повсеместно (Рис. 3). Радиоиммунохимический анализ позволил обнаружить высокий уровень экспрессии 14-3-

3 в экстрактах мозга, семенников и кишечника, где концентрация 14-3-3 превышает 0,5% от общего количества белка. В ткани мозга содержание 14-3-3 особенно высокое и может достигать 1,3% от растворимых белков (т.е. около 40 мкМ в расчете на субъединицу 14-3-3) [101]. В почках и гемолизате концентрация 14-3-3 минимальна и составляет около 0,008% от общего содержания белка [101]. Любопытно отметить, что наличие всех 7 изоформ 14-3-3 было показано в роговице и слизистой оболочке глаза, а изоформы ζ и γ также были обнаружены в слезной жидкости человека [102].

Среди изоформ 14-3-3 строгой тканевой специфичностью, по-видимому, обладает только σ изоформа, в то время как остальные 6 изоформ 14-3-3 более или менее равномерно распределены в тканях. 14-3-3 σ , или стратифин, характерна в основном для эпителиальных тканей, где и была впервые обнаружена [103]. Изначально считалось, что τ/θ изоформа 14-3-3, обнаруженная в Т-клетках, также тканеспецифична, однако потом экспрессия данной изоформы была показана в мозге и других тканях [64], хотя уровень ее экспрессии в них невысок [104, 105].

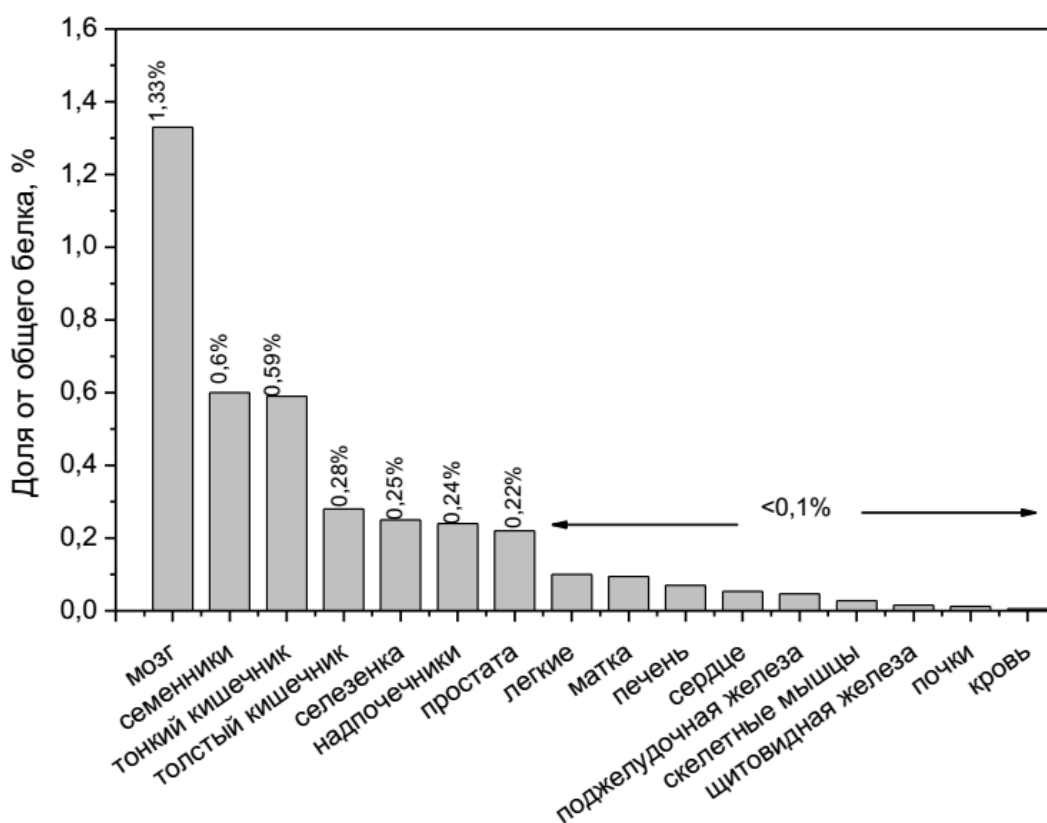


Рис. 3. Тканевое распределение белков 14-3-3. На основе данных радиоиммунохимического анализа [101].

Пространственная структура белков 14-3-3

К настоящему времени определена структура всех семи изоформ 14-3-3 человека [71, 72, 106] и многих представителей из других источников, включая растения, дрожжи и простейших [107-109]. По данным РСА, белки 14-3-3 формируют W-образные димеры, в которых каждый мономер построен из 9 α -спиралей и содержит один участок связывания лигандов – амфипатическую бороздку (АБ) (Рис. 4). Спирали α_5 - α_9 формируют боковые стенки димера, а α_1 - α_4 спирали образуют дно димера и обширную область димеризации, а С-концевой сегмент практически всегда отсутствует в картах электронной плотности из-за подвижности (Рис. 4). Спирали α_1 и α_2 одной полипептидной цепи контактируют с α_3 и α_4 спиралью другой цепи таким образом, что субъединицы в димере оказываются расположенными антипараллельно. Спирали α_3 и α_4 являются самыми протяженными (~55 Å), в то время как α_1 и α_2 спирали – самые короткие (~25 Å в длину) (Рис. 4). Поиск отдельных доменов в базе данных *InterPro* (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) классифицирует конформацию 14-3-3 как уникальную. В более общем смысле, 14-3-3 можно рассматривать как эволюционировавших членов Tetratricopeptide Repeat (TPR) суперсемейства α -спиральных белков: TPR и TPR-содержащие белки были обнаружены во всех живых царствах [110], однако у прокариот белки 14-3-3 не обнаружены.

В структуре растительного 14-3-3 под названием GF14 ω (general factor 14-omega), гомологичного ζ изоформе человека, имеется последовательность –ELDTLSEESYKD–, отдаленно напоминающая мотив «EF-руки» для связывания ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} [111]. Несмотря на наличие в 14-3-3 ζ человека точно такой же последовательности, связывание двухвалентных ионов с 14-3-3 млекопитающих подтвердить не удалось [112].

Стабилизация димерной конформации 14-3-3 ζ осуществляется за счет трех солевых «мостиков» Arg18–Glu89, Glu5–Lys74, Asp21–Lys85 (в димере их 6 из-за антипараллельности; указана нумерация для ζ изоформы), а также слабополярных и гидрофобных взаимодействий, включая остатки Leu12, Ala16, Ser58, Val62, Ile65 и Tyr82 (Рис. 5) [113]. Первый солевой мостик Arg18–Glu89 и все слабые контакты, указанные выше, присутствуют в структуре гомодимеров всех изоформ 14-3-3 человека, второй мостик Glu5–Lys74 отсутствует у σ , η , ϵ и γ изоформ. Третий мостик Asp21–Lys85 участвует в формировании димеров всех изоформ, за исключением ϵ . Ввиду этой особенности, ϵ изоформа обладает выраженной склонностью к гетеродимеризации с остальными изоформами, кроме σ [113-115]. Для σ изоформы отмечено образование альтернативного

солевого мостика Lys9–Glu83 [113]. Данные PCA были подтверждены методом точечного мутагенеза. Так, было установлено, что мутации остатков 5 и 12 в α_1 -, а также остатков 82, 85 и 87 в α_4 -спиралях 14-3-3 ζ приводят к нарушению межсубъединичных контактов в этом белке [116]. Аналогично мутирование остатков 5 в α_1 -, 20 в α_2 -, а также 55 в α_3 - и 80 в α_4 -спиралях σ изоформы приводит к изменению межсубъединичных контактов для этой изоформы 14-3-3 и изменению ее взаимодействия с другими изоформами этого белка [116]. Важную роль в регуляции димерного состояния 14-3-3 играет остаток Ser58 (Рис. 5), расположенный на α_3 -спирали каждого мономера ζ , β , ϵ , γ и η изоформ (изоформы σ и τ в данном положении имеют аланин). Фосфорилирование Ser58 может сильно дестабилизировать димер 14-3-3 [117-119] и влиять на способность гетеродимеризоваться и взаимодействовать с белками-партнерами [120].

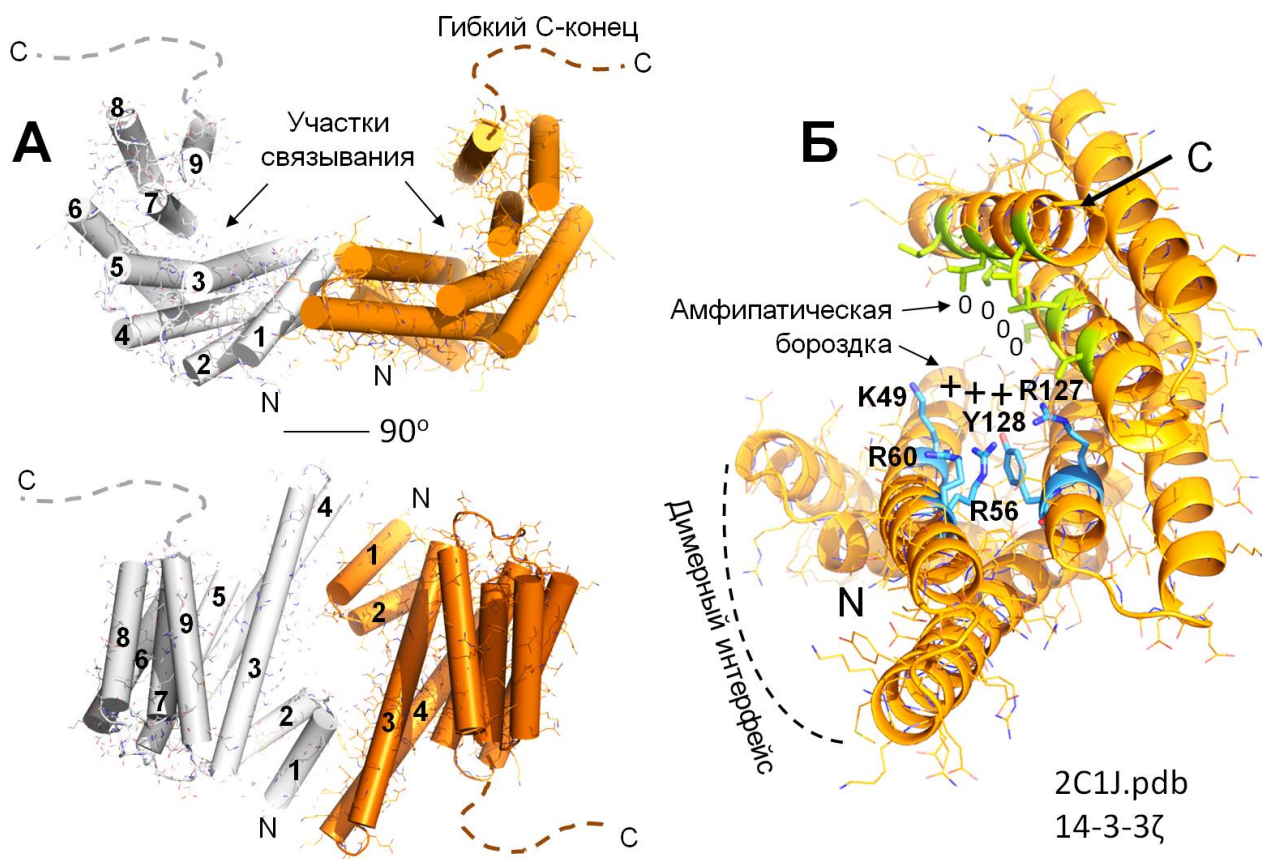


Рис. 4. Пространственная структура 14-3-3 ζ человека. А. Кристаллографический димер (код PDB 2C1J) показан в двух перпендикулярных проекциях с цилиндрическими α -спиралями, пронумерованными от N- до С-конца, и гибким С-концом, обычно отсутствующим в картах электронной плотности (нарисован пунктирными линиями). Две субъединицы показаны разными цветами. Б. Структурные элементы субъединицы 14-3-3, показывающие область димерного интерфейса и амфипатическую бороздку, где происходит связывание фосфопептида. Гидрофобная область бороздки обозначена зеленым цветом (нейтральный заряд, «0»), а полярная сторона – синим («+» заряды). Показаны остатки первичного сайта связывания. Модели нарисованы в программе PyMOL 2.20 (Schrödinger).

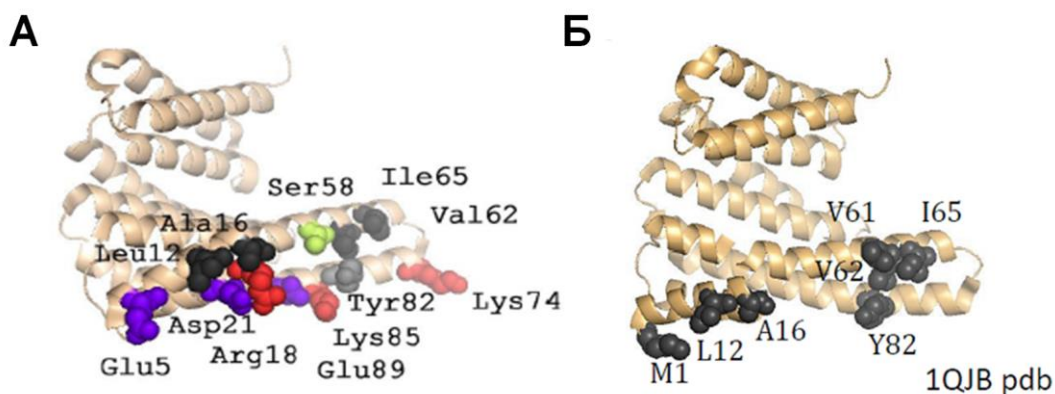


Рис. 5. Аминокислотные остатки, вовлеченные в образование межсубъединичных контактов в димере 14-3-3 ζ . Субъединица показана со стороны интерфейса. На панели А отмечены остатки разной природы, на панели Б – только гидрофобные. Модели нарисованы в программе *Pymol 2.20* (Schrödinger).

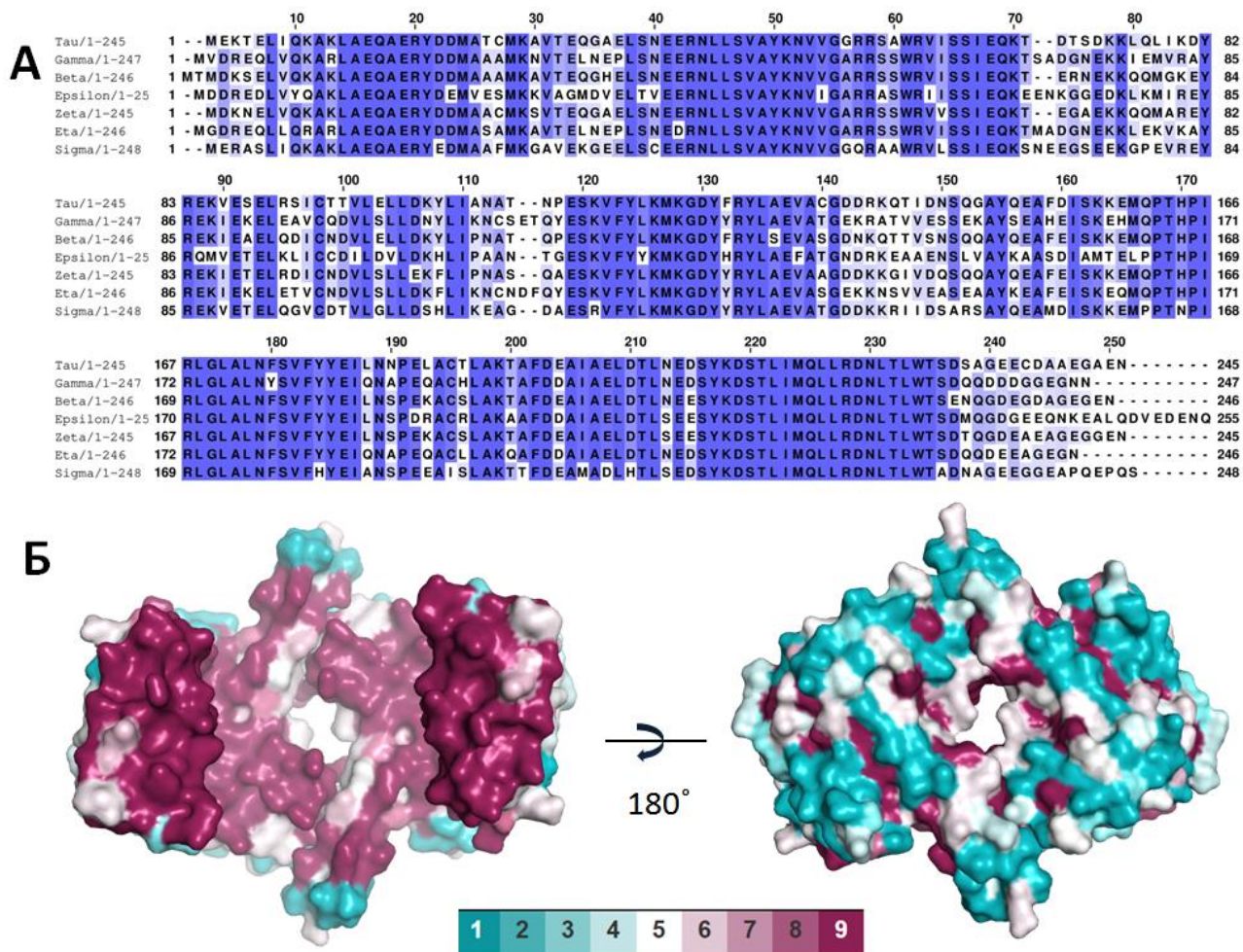


Рис. 6. Консервативность изоформ 14-3-3 человека. А. Множественное выравнивание последовательностей семи изоформ, выполненное с помощью *ClustalOmega*. Градиентом цвета кодирован уровень идентичности. Б. Картирование поверхности димера 14-3-3, отражающее степень консервативности с помощью *Consurf* [121] по шкале от 1 (самые переменные участки) до 9 (самые инвариантные), приведенной внизу.

Считается, что одним из факторов, влияющих на специфичность функционирования изоформ 14-3-3 является их склонность к образованию гомо- и гетеродимеров определенного состава [73, 116]. Не все изоформы 14-3-3 способны образовывать гетеродимеры. Например, в области димеризации молекулы 14-3-3 σ были выявлены уникальные остатки Ser5, Glu20, Phe25, Gln55 и Glu80, способствующие образованию гомодимеров, но несовместимые с гетеродимеризацией с другими изоформами. Эта особенность, по всей видимости, наделяет 14-3-3 σ уникальными свойствами [116, 122].

Существует гипотеза, согласно которой способность 14-3-3 образовывать гетеродимеры из мономеров различных изоформ значительно расширяет круг возможностей 14-3-3 [73]. Возможно, образование гетеродимеров необходимо для связывания определенных белков-партнеров или открывает возможность для одновременного связывания таких белков-партнеров, которые сами по себе друг с другом не взаимодействуют. Например, было показано, что для связывания белка Nedd4-2, принимающего участие в альдостерон-опосредованной регуляции натриевых каналов, необходимо образование именно гетеродимеров β и ϵ изоформ 14-3-3 [123]. Формирование гетеродимеров 14-3-3 также необходимо для связывания крестообразных структур ДНК, часто расположенных вблизи точек начала репликации [124]. Тем не менее, до сих пор точно не ясны основы изоформенной специфичности белков 14-3-3, поскольку главный участок связывания белков-партнеров – амфипатическая бороздка – является наиболее консервативным элементом структуры, практически идентичным у всех изоформ 14-3-3 человека (Рис. 6). Это указывает на потенциальную роль внешних поверхностей димера 14-3-3, которые обладают большей вариабельностью (Рис. 6), во взаимодействии с белками-партнерами.

С-концевая часть 14-3-3 (~15-35 последних остатков) не обнаруживается в кристаллических структурах из-за выраженной разупорядоченности (Рис. 4). Эта часть является вариабельной по длине и аминокислотному составу в разных представителях 14-3-3 (Рис. 1 и Рис. 6А). 14-3-3 белки дрожжей, обозначаемые VMH1 и VMH2, имеют удлиненные С-концевые сегменты, обогащенные последовательно расположенными остатками глутамина [125], которые гипотетически могут отвечать за способность дрожжевых 14-3-3 включаться в амилоиды, аналогично тому, как это известно для других полиглутамин-богатых белков [126-128]. С-концевая часть белков 14-3-3 растений может образовывать дополнительные α -спирали [129], однако роль этих спиральных частей остается неясной. Было высказано предположение, что гибкие С-концевые концы 14-3-3 ζ человека могут связываться в АБ (Рис. 4) и играть аутоингибиторную роль, ограничивая связывание низкоаффинных

партнеров с 14-3-3 [72, 130]. С-концевые области 14-3-3 и белков-шаперонов из семейства малых белков теплового шока (sHSP), предотвращающих агрегацию частично-денатурированных белков, обладают некоторой гомологией [131]. С учетом, что недавно у 14-3-3 было показано наличие шапероно-подобной активности [131-135], было сделано предположение, что С-концевые хвосты белков 14-3-3 могут быть вовлеченными в такой тип активности [131].

Взаимодействие 14-3-3 с фосфопептидами

В 1996 году было впервые показано, что взаимодействие 14-3-3 с белками-партнерами обусловлено фосфорилированием остатка серина [74], а чуть позже использование библиотек синтетических пептидов позволило установить предпочтительные последовательности для связывания 14-3-3 – консенсусные мотивы I и II (Табл. 2), содержащие фосфосерин или фосфотреонин [34, 136]. Это позволило идентифицировать 14-3-3 как сенсоры фосфорилирования остатков серина или треонина. Довольно быстро стало понятно, что подобные мотивы встречаются во многих белках, которые служат партнерами белков 14-3-3 в регуляции жизненно-важных внутриклеточных процессов [137]. Вскоре было показано, что 14-3-3-связывающие фосфопептиды могут находиться не только внутри последовательности белка-партнера, как в случае мотивов I и II, а также в самом С-конце. В результате было постулировано также существование мотива III (Табл. 2) [35, 138].

По данным PCA, консервативные остатки Lys49, Arg56, Arg60, Arg127 и Tyr128 14-3-3 ζ принимают участие в координации фосфогруппы пептидов в амфипатической бороздке 14-3-3, а ее гидрофобная поверхность способствует их правильному позиционированию (Рис. 4Б). Кроме фосфорилированных, оказалось, что в некоторых случаях 14-3-3 могут прочно связывать и нефосфорилированные пептиды, как, например, пептиды LDLA в экзотоксинах S и T [139, 140]. При помощи метода фагового дисплея был найден похожий нефосфорилированный пептид WLDLE (так называемый пептид R18), обладающий крайне высоким сродством к 14-3-3 ($K_D = 7.9 \cdot 10^{-8}$ M) [141]. Выяснилось, что связывание R18 и нефосфорилированных пептидов экзотоксинов S/T происходит в той же амфипатической бороздке 14-3-3, но в другой ориентации, чем в случае фосфопептидов [142, 143] (Рис. 7). Несмотря на прочное взаимодействие с АБ 14-3-3, нефосфорилированные пептиды являются скорее исключением, и большинство лигандов 14-3-3 содержат фосфорилированные остатки серина или треонина.

Табл. 2. Примеры фосфопептидов, связываемых белками 14-3-3.

Мотивы	Последовательность	Ссылки	
Мотив I	-RXX [pS/pT] X [P/G] -	[34, 136]	
Мотив II	-RX [F/Y] X [pS/pT] X [P/G] -	[34, 136]	
Мотив III	- [pS/pT] X ₀₋₂ -COOH	[35]	
Примеры белков	Последовательность	K _D , μM	Ссылки
LRRK2 пептид 1	IKARASpS ¹⁴⁴⁴ SPVILV*	0,13	[144]
HSPB6	RRApS ¹⁶ APLP	2-6	[145]
PMA2	QSYpTV-COOH	2,5	[146]
HDAC4	LPLYTSPpS ³⁵⁰ LPNITLGLP	9-13	[147]
p53	LMFKpT ³⁸⁷ EGPD	16,3	[148]
c-RAF пептид 1	RQRSTpS ²⁵⁹ TPNVH	17	[149]
Шибби	RKSApS ²⁰ LS	43,5	[150]
LRRK2 пептид 2	KRKILSpS ⁹⁵⁵ DDSLRS*	93,5	[144]
c-RAF пептид 2	QHRYPs ²³³ TPNAF	171	[149]
α4 интегрин	FKRQYKpS ¹⁰¹¹ ILQE	315	[151]
PAD6	SSFYPpS ⁴⁴⁶ AEG	-	[152]

* Два из шести пептидов LRRK2, которые служат для связывания с 14-3-3.

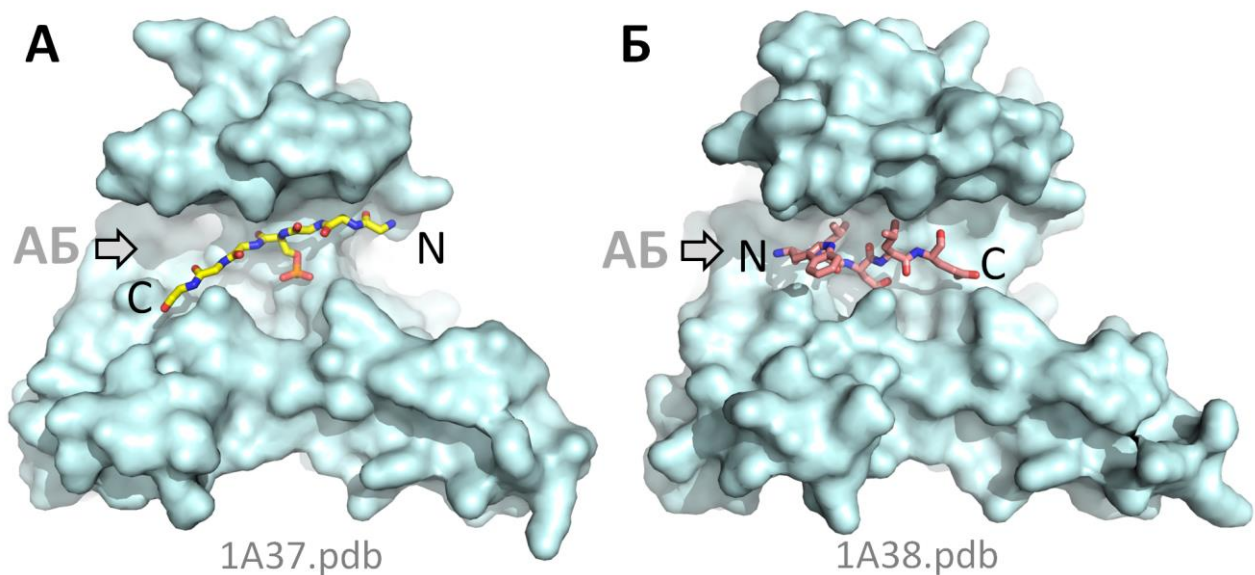


Рис. 7. Ориентация фосфорилированного (А, желтый) и нефосфорилированного (Б, коричневый) пептидов в амфипатической бороздке (АБ) 14-3-3 (светло-голубая поверхность). Направление хода цепи пептида показано положением N и C концов пептидов. Ниже приведены коды структур в PDB, использованные для построения моделей. Модели нарисованы в программе *Pymol* 2.20 (Schrödinger).

Накопление данных по взаимодействию различных фосфопептидов с 14-3-3 со временем дало понять, что изначально установленные консенсусные мотивы не всегда обязательны, и значительное число экспериментально подтвержденных белков-партнеров 14-3-3 если и содержат фосфосерин/треонин, то в окружении, порой значительно

отличающемся от мотивов I-III (Табл. 2). Более того, до сих пор не совсем понятна корреляция последовательности фосфопептида и его аффинности к 14-3-3, что наглядно иллюстрируется данными в Табл. 2. Видно, что кажущаяся константа диссоциации комплекса 14-3-3 с фосфопептидами может варьировать от десятков нМ до сотен мкМ. В настоящее время, на основе экспериментально подтвержденных данных разрабатываются подходы, нацеленные на предсказание 14-3-3-связывающих участков в исследуемых белках, такие как *14-3-3-Pred* [153]. Несмотря на большой прогресс в данном направлении, очевидно, что чрезвычайно обширный интерактом белков 14-3-3 требует накопления большого массива экспериментальных данных о структуре комплексов 14-3-3 с самыми разными фосфопептидами и об аффинности таких взаимодействий.

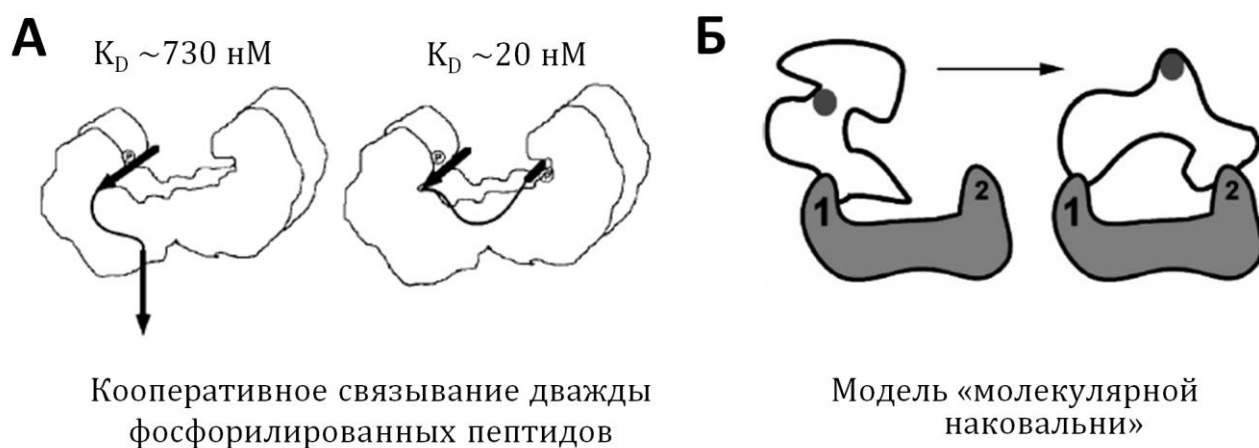


Рис. 8. Особенности взаимодействия димеров 14-3-3 с фосфорилированными белками-партнерами. А. Бидентатное, кооперативное связывание дважды фосфорилированных пептидов за счет взаимодействия с обеими амфипатическими бороздками 14-3-3. Приведены кажущиеся константы диссоциации комплексов. По данным [34]. Б. Модель «молекулярной наковальни», объясняющая влияние 14-3-3 на функционирование дважды фосфорилированного белка-партнера за счет последовательного взаимодействия фосфорилированных участков с амфипатическими бороздками 14-3-3. По данным [154].

В белке может быть более одного фосфорилированного участка для связывания с 14-3-3. Помимо остатка Ser/Thr, занимающего центральное положение в мотивах I и II, остаток серина в положении -2 также может фосфорилироваться. Это явление было описано для белков p53 и Cdc25C, тандемное фосфорилирование которых по остатку в положении -2 приводило к ослаблению связывания 14-3-3 [155, 156]. Аналогично наличие соседних фосфорилированных остатков в пептиде значительно снижает его сродство к 14-3-3 [157].

В то же время пептиды, содержащие два фосфорилированных сайта, расположенных на расстоянии не менее 14-15 аминокислотных остатков друг от друга, связываются гораздо прочнее, чем монофосфорилированные последовательности [34, 144, 158, 159]. Это становится понятно с учетом антипараллельности димера 14-3-3, поскольку дважды фосфорилированные фрагменты могут занимать обе амфипатические бороздки 14-3-3, связываясь с определенным изгибом (Рис. 8А).

Была предложена красивая гипотеза, которая сравнивала структурированный димер 14-3-3 с молекулярной наковальней [154], при пошаговом связывании с которой дважды фосфорилированных пептидов происходит изменение конформации белка-партнера, необходимое для регуляции его функции (Рис. 8Б). Несмотря на привлекательность такой гипотезы, во многих случаях 14-3-3 связываются с гибкими, структурно-разупорядоченными фрагментами – IDR. В этой связи, вероятно, более корректно предполагать не изменение конформации, а ограничение конформационной свободы у дважды фосфорилируемого белка-партнера при его взаимодействии с относительно более жесткими белками 14-3-3. В таком случае, нам представляется более корректным сравнение процесса взаимодействия с 14-3-3 не с ковкой, а с литьем.

Особенности взаимодействия 14-3-3 с белками-партнерами

Большое открытие было сделано при биоинформатическом анализе белков, способных взаимодействовать с 14-3-3. Было обнаружено, что более 90% участков связывания 14-3-3 расположено в IDR областях, обогащенных остатками R, K, E, P и S (способствующими структурной разупорядоченности) и одновременно обедненных остатками C, W, Y, I и V (способствующими структурной упорядоченности [160]) [161]. Анализ доступных структур комплексов 14-3-3 с белками-партнерами наглядно иллюстрирует необходимость фосфопептидов располагаться в гибких участках для того, чтобы эффективно занимать амфипатические бороздки структурированных димеров 14-3-3 (примеры представлены на Рис. 9А и Б). Гибкие фосфорилированные сегменты могут достигать 20-40 и более остатков в длину. При их взаимодействии с 14-3-3 происходит частичное упорядочивание таких неструктурированных участков, в соответствии с принципом «folding upon binding» [27, 28]. Принципиально важно, что комплексы 14-3-3 с фосфорилированными фрагментами могут стабилизироваться за счет низкомолекулярных соединений, связывающихся в интерфейсе 14-3-3/фосфопептид, что может вызывать

дальнейшее упорядочивание неструктурированных фосфорилированных IDR (Рис. 9B). Ввиду участия 14-3-3 в регуляции множества внутриклеточных процессов, а также в развитии целого ряда патологий, взаимодействие 14-3-3 с белками-партнерами представляется чрезвычайно перспективной мишенью при подборе лекарств [3, 162]. Стоит отметить, что наличие протяженных неструктурированных участков в белках-партнерах 14-3-3 делает получение комплексов и их структурные исследования чрезвычайно трудоемкими. По-видимому, гибкие участки в составе комплексов делают структуру более динамичной, что затрудняет кристаллизацию.

Белки-партнеры могут взаимодействовать с 14-3-3 с образованием комплексов разной стехиометрии в зависимости от своего олигомерного состояния и количества 14-3-3-связывающих центров. Примеры нескольких комплексов с разной стехиометрией приведены на Рис. 10А. К началу нашей работы единственной установленной пространственной структурой была полученная в 2001 году кристаллическая структура комплекса 14-3-3 ζ с ферментом AANAT (Aryl Alkylamine N-Acetyl Transferase), который участвует в регуляции циркадных ритмов [163]. Получение этой структуры стало настоящим прорывом в развитии направления. Однако для кристаллизации авторам потребовалось использование укороченной конструкции AANAT, которая была лишена важного С-концевого 14-3-3-связывающего пептида вокруг остатка Ser205 [138]. Это привело к изменению стехиометрии комплекса с 2:1 до 2:2 и, в итоге, не позволило получить важную информацию о взаимодействии 14-3-3 с одним из первых обнаруженных С-концевых пептидов мотива III (Рис. 11).

Связывание белков-партнеров, в составе которых есть два и более 14-3-3-связывающих центра, может иметь огромный смысл в каскадах передачи сигнала. По аналогии с радиоэлектронными схемами, было предположено, что дитопические (ditopic, т.е. имеющие два центра связывания), структурно жесткие белки 14-3-3 могут действовать как «логические элементы» и «детекторы совпадений», которые интегрируют различные входные сигналы (сайт-специфическое фосфорилирование различными протеинкиназами), превращая их во взвешенный выходной сигнал (эффекты, вызванные связыванием 14-3-3) [81]. Действительно, согласованное действие двух киназных каскадов может быть необходимо для запуска определенных эффектов, опосредованных связыванием 14-3-3. Такое, по всей видимости, происходит в случае фосфорилирования проапоптотического белка BAD с помощью протеинкиназ ERK1/2, PKB/Akt и PKA [164] или фосфорилирования белка AS160 (субстрат Akt 160 кДа), регулирующего поглощение глюкозы, протеинкиназами

PKB/Akt и AMPK [165, 166]. В этом контексте белки 14-3-3 по праву могут рассматриваться как читатели (readers) и исполнители (executors) кода фосфорилирования, который устанавливается протеинкиназами (writers) в ответ на различные внутри- или внеклеточные стимулы.

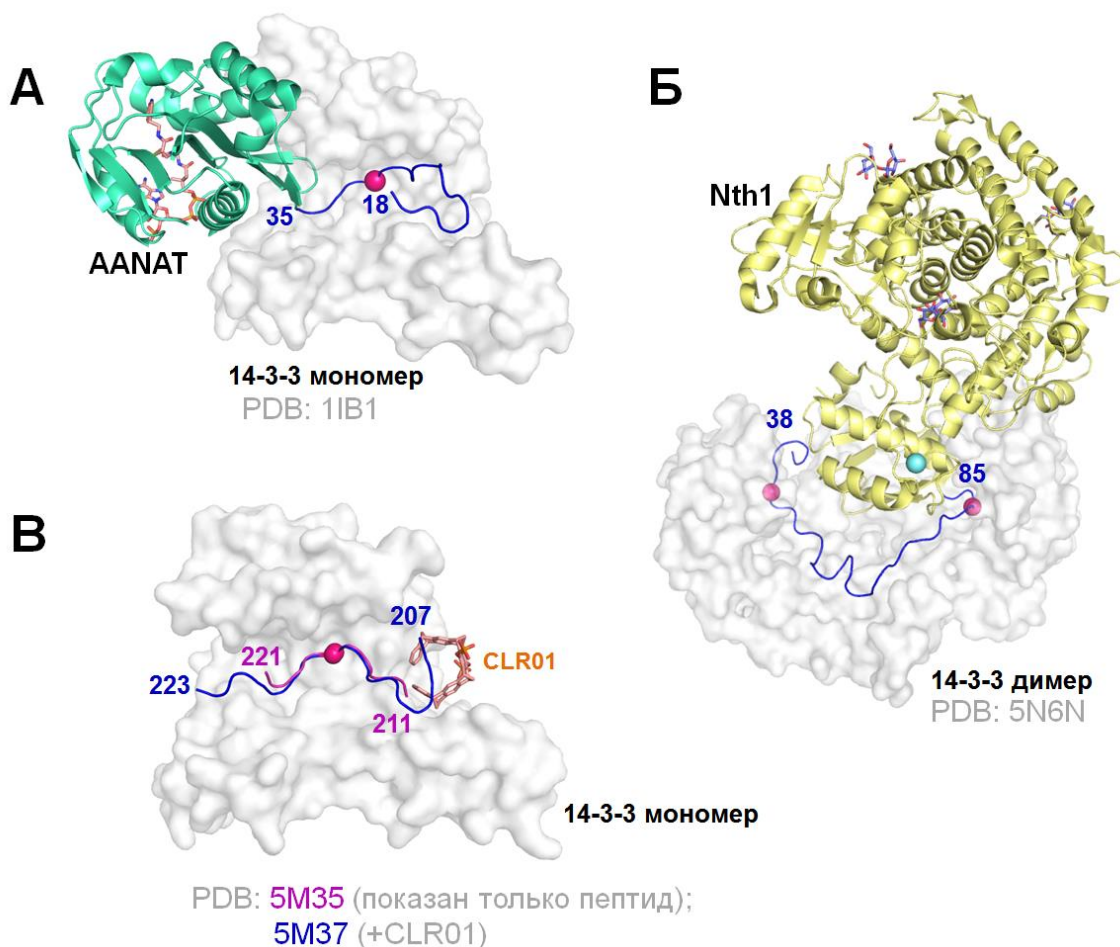


Рис. 9. Взаимодействие 14-3-3 с белками-партнерами основывается на связывании разупорядоченных участков (IDR), несущих фосфорилированные остатки. Кристаллические структуры комплексов 14-3-3 с AANAT (А) и Nth1 (Б). На панели А для наглядности показано связывание только с одной субъединицей 14-3-3. Мономер и димер 14-3-3 показаны полупрозрачной серой поверхностью, белки-партнеры показаны в виде ленточных диаграмм разных цветов. IDR, связывающиеся с 14-3-3, показаны синим цветом, фосфорилированные остатки, связывающиеся в АБ, показаны розовыми сферами. Ион Ca в структуре Nth1 показан светло-голубым, лиганды AANAT и Nth1 показаны палочками. В. Стабилизация интерфейса 14-3-3/CDC25C за счет образования тройного комплекса с соединением CLR01, что упорядочивает пептид CDC25C. Видно, что фосфорилированные IDR (синие ленты на панелях А-В) принимают при связывании с 14-3-3 разные конформации. Граничные остатки сегментов IDR пронумерованы, чтобы показать их длину. Модели нарисованы в программе PyMOL 2.20 (Schrodinger).

Особую сложность представляют исследования взаимодействия дитопического белка 14-3-3 с белками-партнерами, содержащими многочисленные сайты фосфорилирования,

поскольку в этом случае стехиометрию и механизм связывания невозможно предсказать *a priori*, без тщательного систематического анализа. Такие примеры включают взаимодействие 14-3-3 с (i) белком Тау, участвующим в развитии болезни Альцгеймера и других тауопатий (минимум 3-7 14-3-3-связывающих сайтов [167, 168]), (ii) белком CFTR, участвующим в развитии муковисцидоза (девять сайтов связывания 14-3-3 [169]), и (iii) протеинкиназой LRRK2, которая связана с развитием болезни Паркинсона (минимум шесть 14-3-3-связывающих сайтов [144]).

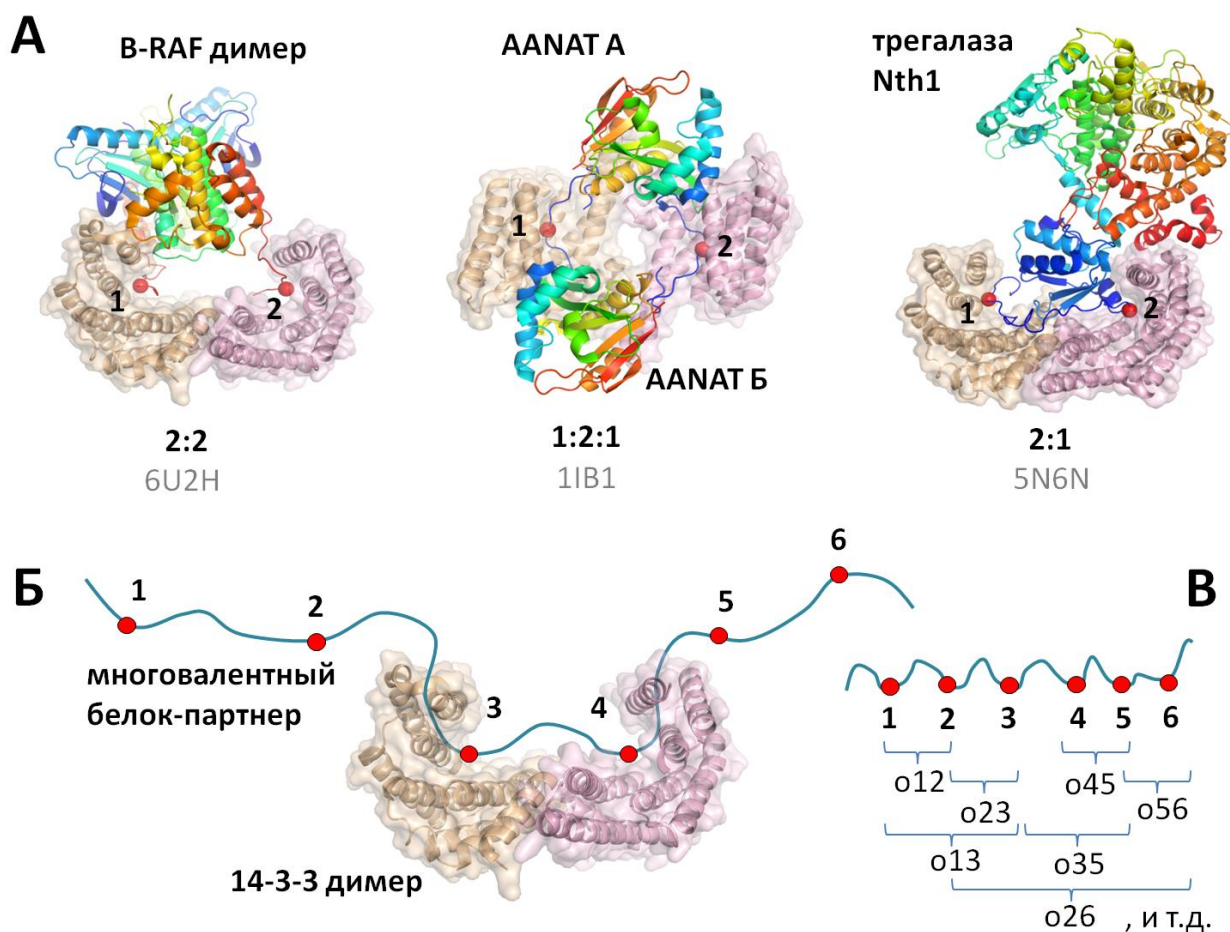


Рис. 10. Вариации стехиометрии в комплексах с участием димеров 14-3-3. А. Примеры стехиометрии 2:2, 1:2:1 (димер связан с двумя мономерами, не взаимодействующими между собой) и 2:1, наблюдаемые в кристаллических структурах 14-3-3 димеров с белками-партнерами. Названия белков указаны выше, коды PDB представлены ниже. Структуры приведены в масштабе, но показаны под разными углами для наглядности. 14-3-3 димер показан светло-розовым и пшеничным, связанные полипептиды показаны градиентом от синего (N-конец) до красного (С-конец), фосфорилированные остатки показаны красными сферами, сайты связывания пронумерованы 1 и 2. Б. Схема, показывающая связывание димера 14-3-3 с гипотетическим поливалентным белком, содержащим шесть фосфорилированных сайтов. В. Разные комбинации указанных фосфорилированных участков могут давать разные эффекты (output) при дитопическом связывании димера 14-3-3 (o12, o23 и т.д. указывают эффект от связывания сайтов 1 и 2 или 2 и 3 и т.д.). Модели нарисованы в программе PyMOL 2.20 (Schrödinger).

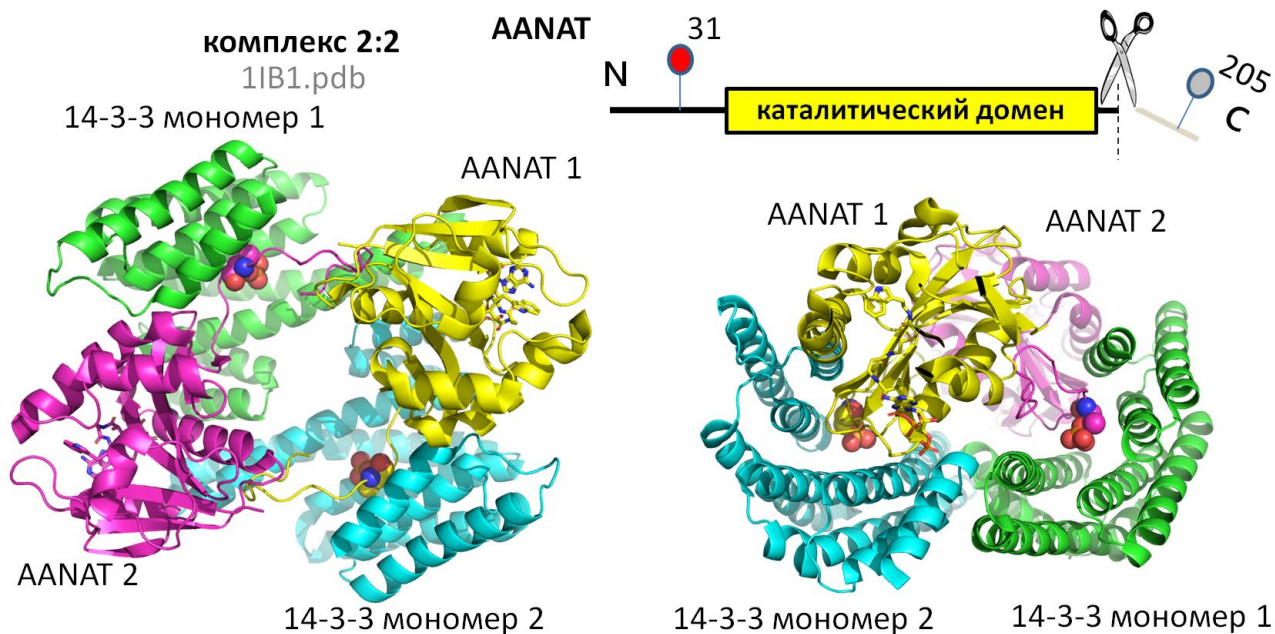


Рис. 11. Кристаллическая структура комплекса 14-3-3 с ААНАТ, укороченной с С-конца. Показана модель структуры комплекса в ненативной стехиометрии 1:2:1 (код PDB 1IB1) в двух ракурсах (14-3-3 димер показан лентой с субъединицами зеленого и светло-голубого цвета, а мономеры ААНАТ пурпурной и желтой лентой, фосфорилированные остатки, связанные с амфипатическими бороздками показаны сферами). Сверху справа показана схема первичной структуры ААНАТ. Для получения кристаллической структуры комплекса потребовалось усечение конструкции ААНАТ с С-конца, что привело к удалению С-концевого 14-3-3-связывающего участка и изменению общей стехиометрии комплекса с 2:1 (димер 14-3-3 на мономер ААНАТ) на 1:2:1 (два не связанных между собой мономера ААНАТ на димер 14-3-3). Модели нарисованы в программе *PyMOL 2.20* (Schrödinger).

Как было отмечено выше, если фосфосайты расположены слишком близко друг к другу в последовательности, они могут мешать связыванию 14-3-3. Чтобы способствовать связыванию 14-3-3, они должны быть разделены, по меньшей мере, 15 остатками, не образующими жестких структурных элементов, в противном случае антипараллельный димер 14-3-3 может вместить только один из них. Сайты, которые находятся слишком далеко друг от друга, как в последовательности, так и в пространстве (например, в больших многодоменных белках, таких как LRRK2 длиной ~2500 аминокислотных остатков [144]), могут служить для связывания различных молекул 14-3-3, если архитектура многодоменного белка не допускает его 14-3-3-опосредованной деформации. Например, синергичное связывание трех димеров 14-3-3 с С-концевыми хвостами димеров Н⁺-АТФазы плазматической мембраны растений превращает этот фермент в активный гексамер [170, 171]. Хотя это несколько спекулятивно из-за отсутствия прямой структурной информации о

14-3-3 комплексах с полноразмерными многовалентными белками, присутствие IDR должно быть особенно полезным для образования комплексов 14-3-3 с большими многовалентными белками, состоящими из нескольких жестких доменов. Многовалентность может приводить к различным конфигурациям связывания 14-3-3, включающим разные комбинации сайтов связывания, и каждая комбинация может обеспечивать свой эффект (Рис. 10Б).

Это подчеркивает важность исследований, направленных на определение механизма связывания, которое декодирует сложный сигнал мультиточечного фосфорилирования через белки 14-3-3. Множественное фосфорилирование действительно создает определенную *биологическую сложность*, которую белки-исполнители могут интерпретировать как *код фосфорилирования*, и эта сложность может быть выражена в числах. В примере, изображенном на Рис. 10Б, связывание димера 14-3-3 с шестивалентным фосфобелком генерирует $6!/2!*4! = 15$ уникальных комбинаций выходного сигнала с учетом дитопического связывания, плюс 6 возможных событий связывания с одним сайтом (всего 21 вариант). Аналогично для 9-валентного партнера существует 36 уникальных возможных выходных сигналов при дитопическом связывании, плюс 9 событий связывания с одним сайтом (всего 45) [172]. Даже если некоторые из этих вариаций не реализуются из-за низкого сродства или стерических затруднений, репертуар выглядит довольно богатым. Принимая во внимание различия в сродстве связывания отдельных сайтов, многовалентность создает весьма сложную иерархию событий связывания, которая усложняет механизм связывания и делает его расшифровку увлекательной, но крайне трудоемкой задачей.

Многофункциональность белков 14-3-3

Десятилетия исследований не выявили какой-либо ферментативной активности у представителей семейства 14-3-3, за исключением, возможно, недавно обнаруженной способности гидролизовать АТФ [173]. Впрочем, эта активность пока плохо исследована и остается, до некоторой степени, спекулятивной. Фосфопептид-связывающая способность долгое время считалась основным функциональным свойством белков 14-3-3, объясняющим их участие в регуляции физиологических процессов. Накопленные данные свидетельствуют о том, что последствия связывания 14-3-3 можно свести к нескольким категориям (Рис. 12). Связывание 14-3-3 с фосфорилированным белком-партнером может i) предотвращать его дефосфорилирование и/или деградацию, ii) активировать или ингибировать его ферментативную активность в зависимости от того, активная или неактивная форма является

фосфорилированной, iii) влиять на внутриклеточную локализацию белка-партнера, удерживая его фосфорилированную форму в каком-либо компартменте, и iv) быть необходимо для связывания двух разных белков-партнеров с димером 14-3-3 (адапторная функция; scaffold function) [1, 64, 78].

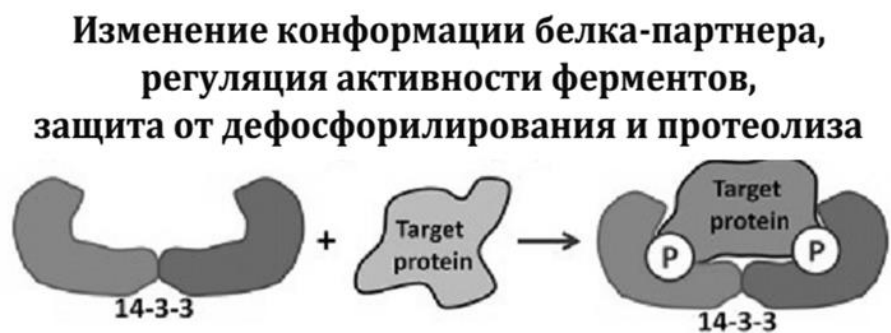
Недавние работы показали, что фосфопептид-связывающая активность белков 14-3-3 дополняется несколькими дополнительными функциями (moonlighting activity). Например, было показано, что белки 14-3-3 могут связываться с суперспиральной ДНК [174] и крестообразными структурами ДНК и даже участвуют в регуляции репликации [124, 175-177]. Однако способность 14-3-3 связывать ДНК не так хорошо исследована, и ее связь с основной фосфопептид-связывающей функцией остается неясной.

Совсем недавно было обнаружено, что помимо фосфорилированных пептидов белки 14-3-3 могут узнавать и связывать пептиды, специфически модифицированные O-GlcNAc (O-linked β -N-acetylglucosamin), и что связывание также происходит в амфипатических бороздках 14-3-3 (код PDB 6BYJ) [178]. Можно предполагать, что белки 14-3-3 играют роль интеграторов двух независимых сигнальных путей для регуляции многочисленных физиологических функций.

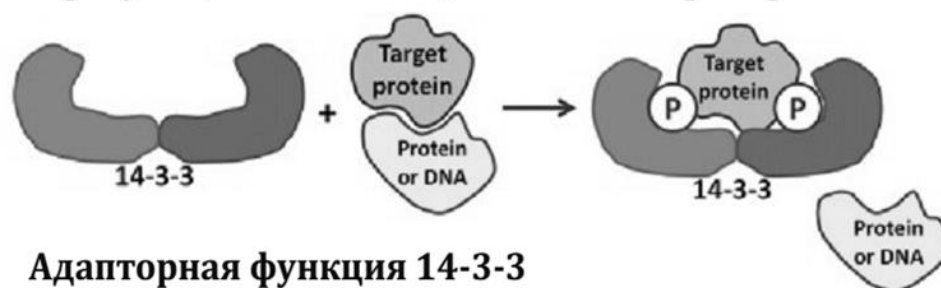
Наконец, особенно примечательно, что белкам 14-3-3 приписывают так называемую шапероно-подобную активность, которая, как правило, не зависит от фосфорилирования белков-партнеров. Предполагается, что такая второстепенная активность позволяет белкам 14-3-3 дополнять функции специализированных белков-шаперонов и предотвращать агрегацию частично денатурированных и неправильно свернутых белков (см. ниже), а также некоторых белков IDP, таких как Тау, хантингтин и α -синуклеин (в Табл. 3 приведены примеры белков-субстратов и партнеров 14-3-3 в выполнении шапероно-подобной функции). Шапероно-подобная активность, по-видимому, связана с общим свойством белков 14-3-3 довольно неспецифично узнавать неструктурированные области (IDR) в различных белках.

Вероятно, именно антиагрегационная активность 14-3-3 лежит в основе способности этих белков взаимодействовать с сигнальными последовательностями препробелков и регулировать их импорт в митохондрии, поскольку этот процесс происходит при временном разворачивании белков в ходе их транслокации через митохондриальные мембраны [179]. К сожалению, эта весьма интересная гипотеза не была более подробно исследована со времен первых работ в 90-х годах, которые идентифицировали белки 14-3-3 как факторы, стимулирующие митохондриальный импорт (mitochondrial import stimulating factors, MSFs) [180-182]. Аналогично, несмотря на убедительные указания на наличие у белков 14-3-3

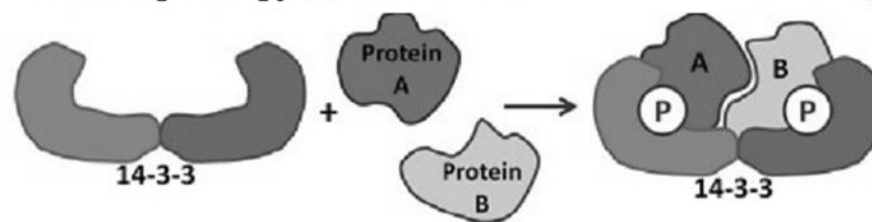
антиагрегационной активности [2, 131, 132, 183], до нашей работы механизм такого режима функционирования, а также его структурные предпосылки оставались загадочными и нуждались в подробных исследованиях.



**Экранирование различных участков белка-партнера,
регуляция локализации белков-партнеров**



Адапторная функция 14-3-3



Шапероно-подобная функция 14-3-3



Рис. 12. Некоторые виды функциональной активности белков 14-3-3. По данным [1], с изменениями.

Табл. 3. Белки-субстраты и белки-партнеры шапероно-подобной активности 14-3-3.

Белки	14-3-3 изоформа	Наблюдаемый эффект 14-3-3	Зависимость от фосфорилирования	Ссылки
Природные субстраты и партнеры				
Апоцитохром с	ζ	Предотвращает агрегацию апоцитохрома с после теплового шока	не зависит	[2]
Тау белок и его пептиды	ζ	Влияет на взаимодействие Тау с микротрубочками, связывает специфические протеинкиназы и Тау, тем самым способствуя фосфорилированию Тау, предотвращает дефосфорилирование Тау, способствует образованию фибрилл Тау.	и так, и так	[184] [185] [186]
Прион (PrP) и его пептиды	β	Дезагрегирует фибриллы, образованные PrP106-126 <i>in vitro</i>	не зависит	[187]
Хантингтин	ζ	Агрегация белков, содержащих полиглутамин	вероятно, не зависит	[188]
Атаксин-1	ε, ζ	Стимуляция агрегации фосфорилированного атаксина-1	зависит	[189]
Паркин	η	Ингибирование убиквитин-лигазной активности паркина	вероятно, не зависит	[190]
α-синуклеин	η	Не взаимодействует с мономером α-синуклеина, взаимодействует с его олигомерами, накапливающимися при амилоидогенезе α-синуклеина, и нарушает процесс агрегации. При очень высокой концентрации α-синуклеина 14-3-3 становится неспособным выполнять свои регуляторные функции	не зависит	[191]
Bag3, динеин, HSP70	ζ, γ, η	Служит адаптером между фосфорилированным Bag3 и промежуточной цепью динеина (DIC), обеспечивая транспортировку неправильно свернутых белков, связанных с комплексом HSP70-Bag3, в агросомы	и так, и так	[192]
Препротеины, HSP70, HSP90	--	Формирует комплекс с HSP70. Регулирует разворачивание и импорт белков в митохондрии. Предотвращает агрегацию и деградацию белков, направляемых в хлоропласты	и так, и так	[193], [194], [195]
HSP9 из <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	BMH1	Hsp9/14-3-3 комплекс взаимодействует с CDC25, модулирует ее фосфатазную активность и тем самым регулирует клеточный цикл	вероятно, зависит	[196]
HSP70 гомолог Ssb	BMH1	Формирует шаперонный модуль, регулирующий переключение между дыханием и ферментацией	вероятно, зависит	[197]
αВ-кристаллин (HSPB5)	ζ	При гепатокарциноме комплекс 14-3-3/HSPB5 усиливает активность ERK1/2, предотвращает действие ингибитора протеинкиназы сорафениба и индуцирует эпителиально-мезенхимальный переход	не зависит	[198]
HSPB6	γ, ζ	Различные изоформы 14-3-3 взаимодействуют с фосфорилированным HSPB6 и модулируют его шапероноподобную активность и регуляторные функции	зависит	[132, 199]
Модельные белки-субстраты				
Цитратсинтаза	ζ	Ингибирование аморфной агрегации, вызванной нагреванием	не зависит	[2]
Инсулин, роданаза	γ	Ингибирование аморфной агрегации, вызванной нагреванием или действием восстановителей	не зависит	[132]
Инсулин, лизоцим, АДГ	ζ	Ингибирование аморфной агрегации, вызванной нагреванием или действием восстановителей	не зависит	[131]

Регуляция функционирования белков 14-3-3

Функционирование белков 14-3-3 может регулироваться различными способами. Во-первых, может изменяться концентрация 14-3-3 в клетке. Например, было показано, что суперэкспрессия 14-3-3 повышает активность Raf-1 киназы и снижает активность протеинкиназы C [200]. Подавление экспрессии 14-3-3 σ приводит к развитию ряда онкологических заболеваний, однако повреждения ДНК могут, наоборот, вызывать p53-опосредованную индукцию синтеза 14-3-3 σ [200]. Во-вторых, может происходить ограниченный протеолиз 14-3-3. Например, некоторые изоформы 14-3-3 являются субстратами каспаз, и их ограниченный протеолиз высвобождает связанные проапоптотические белки (например, BAD и BAX), что индуцирует развитие апоптоза [201, 202].

Вероятно, главным способом регуляции 14-3-3 является фосфорилирование белков-партнеров, без чего взаимодействие с 14-3-3 в большинстве случаев невозможно. Из-за того, что тандемно фосфорилированные участки являются неблагоприятными для взаимодействия с амфипатическими бороздками 14-3-3, сайт-специфическое дефосфорилирование таких белков-субстратов в определенных случаях может усиливать их связывание с 14-3-3. Например, апоптотический регулятор p53 имеет два фосфосерина, Ser376 и Ser378, и в таком состоянии практически не обладает транскрипционной активностью [156]. При дефосфорилировании Ser376 в ответ на повреждения ДНК становится доступным 14-3-3-связывающий центр вокруг остатка Ser378, в результате чего образуется комплекс с 14-3-3, приводящий к активации p53 [156]. Аналогично связывание с 14-3-3 может контролироваться за счет фосфорилирования/дефосфорилирования остатка серина в положении -2 от центрального фосфорилированного остатка в консенсусном мотиве CDC25C [155].

Достаточно необычный способ регуляции был обнаружен при исследовании взаимодействия 14-3-3 с белком hD53, обнаруженным во многих опухолях [203]. Оказалось, что связывание этих белков регулируется за счет с помощью альтернативного сплайсинга гена hD53, затрагивающего экзон, содержащий 14-3-3-связывающую последовательность Y¹³⁰SIRHSISMPAMR¹⁴² в составе hD53 (подчеркнута) [204].

Изменение доступности белков 14-3-3 может быть мощным регуляторным механизмом. Белки 14-3-3 присутствуют в клетке в достаточно высоких концентрациях, однако распределены между различными комплексами, будучи задействованными во многих процессах. При фосфорилировании белков-партнеров, концентрация которых в клетке также

высока, например, виментина [205] и цитокератинов [206], и образовании их комплексов с 14-3-3 будет неизбежно происходить вытеснение других, менее представленных белков из комплексов с 14-3-3, истощая доступную фракцию последних. Дефицит 14-3-3 может значительно влиять на протекание подконтрольных процессов [207].

Наконец, белки 14-3-3 могут регулироваться за счет различных видов ПТМ. Например, было показано ацетилирование остатков лизина в амфипатических бороздках 14-3-3, что экранирует положительный заряд, необходимый для координации фосфогруппы, и нарушает взаимодействия с белками-партнерами [208]. Кроме того, белки семейства 14-3-3 содержат в своем составе несколько участков фосфорилирования под действием различных протеинкиназ. По данным литературы, протеинкиназа SDK1 (продукт каспазного расщепления δ изоформы протеинкиназы C) [209], PKA, активированная сфингозином (но не цАМФ) [210]), некоторые изоформы протеинкиназы C [64], протеинкиназа B (PKB/Akt) [211], а также протеинкиназы JNK [212], Bcr (продукт онкогена Breakpoint cluster region protein) [213] и α -изоформа казеинкиназы I (CKI) [214] могут фосфорилировать остатки Ser58, Ser63, Ser184 и Thr232 в составе 14-3-3. Не все изоформы 14-3-3 содержат указанные остатки Ser/Thr и могут фосфорилироваться. В то же время, даже при наличии, например, остатка Ser58, один и тот же фермент (SDK1) фосфорилирует 14-3-3 ζ , но практически не фосфорилирует эквивалентные остатки в 14-3-3 ϵ и 14-3-3 γ [209]. Фосфорилирование 14-3-3 влияет на структуру и взаимодействие с белками-партнерами.

Остаток Ser58 в 14-3-3 может фосфорилироваться под действием протеинкиназ PKB/Akt [211], PKA [117], MAPKAP2 [118] и PAK6 [215] как *in vitro*, так и *in vivo*. Фосфорилирование Ser58 в 14-3-3 ζ приводит к частичной диссоциации димеров этого белка [117-119, 216, 217]. Также фосфорилирование Ser58 может ослаблять взаимодействие 14-3-3 с транскрипционными факторами p53 [117] и FOXO1 [218], протеинкиназами ASK1 [219], LRRK2 [215] и Raf-1 [118] и циклином D1 [220]. Предполагается, что снижение эффективности взаимодействия с белками-субстратами при фосфорилировании Ser58 обусловлено мономеризацией белка, однако нельзя исключить и прямое влияние фосфорилирования этого остатка на взаимодействие, поскольку он находится вблизи положительно-заряженного кластера аминокислот амфипатической бороздки 14-3-3, которые координируют фосфогруппу (например, остатка Arg56). Поскольку фосфорилирование Ser58 или мутации, имитирующие его (замены S58D и S58E), приводят лишь к частичной диссоциации димеров 14-3-3, многие вопросы, которые касаются свойств мономеров 14-3-3,

до нашей работы оставались открытыми и нуждались в подробном исследовании с использованием подходящей модели мономерной формы белка 14-3-3.

Фосфорилирование 14-3-3 ζ по остатку Ser184 под действием c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK), активируемой при сильных повреждениях ДНК, приводит к высвобождению ряда проапоптотических белков (BAX, BAD, c-Abl и FOXO) из комплексов с 14-3-3, что приводит к запуску апоптоза [212, 221]. Фосфорилирование остатка Thr232, расположенного непосредственно перед гибким С-концевым хвостом 14-3-3, приводит к ослаблению взаимодействия 14-3-3 с различными субстратами, предположительно, за счет стабилизации положения собственного С-концевого пептида 14-3-3 в амфипатической бороздке и усиления автоингибиторного эффекта [72, 222]. В течение циркадных ритмов происходит циклическое фосфорилирование остатка Thr232, вследствие чего нарушается комплекс 14-3-3 с ферментом AANAT (Рис. 11) и снижается его активация, что приводит к замедлению превращения серотонина в мелатонин [223]. Фосфорилирование остатка Thr232 также препятствует нормальному связыванию 14-3-3 с c-Raf [214].

Интерактом белков 14-3-3

Наличие фосфорилируемых последовательностей, соответствующих мотивам I-III связывания с 14-3-3, в областях IDR множества белков определяет огромный размер интерактома белков 14-3-3 (т.е. совокупность их белков-партнеров) и вовлечение 14-3-3 в регуляцию большого числа физиологических процессов (см. некоторые примеры в Табл. 4). По мере развития высокопоточных методов исследований, постоянно обнаруживаются новые белки-партнеры 14-3-3.

Как упоминалось выше, белки 14-3-3 обычно присутствуют в каждом эукариотическом организме в виде нескольких изоформ. Потеря одного гена 14-3-3 не является летальной, однако делеция всех изоформ 14-3-3 приводит к гибели клеток, что определяет гены 14-3-3 как важные (essential). Поиск белков-партнеров 14-3-3 в наиболее популярных базах данных позволяет получить библиотеку из 2871 партнеров, при этом количество известных партнеров для каждой из изоформ отличается (см. Табл. 5). Так, для 14-3-3 ζ обнаруживается наибольшее (805), а для 14-3-3 σ – наименьшее (187) число белков-партнеров. Эти цифры, очевидно, постоянно изменяются по мере актуализации баз данных, однако они подчеркивают внушительный размер интерактома белков 14-3-3.

Табл. 4. Некоторые физиологические процессы, регулируемые с участием белков 14-3-3.

Процесс	Белок-партнер 14-3-3	Ссылки
Регуляция апоптоза	BAD* BAX с-ABL каспаза-2	[224] [201] [225] [226]
Функционирование факторов транскрипции	FOXO4 DAF-16 P53 Gli1-3	[159] [227] [156] [228]
Регуляция гистонов (эпигенетика)	Гистон деацетилазы 4, 5 и 6	[229, 230]
Регуляция клеточного цикла	CDC25 фосфатаза Wee киназа циклины	[231] [232] [220]
Передача сигнала	Raf киназа KSR1 Регуляторы G белков Фосдуцин GPCR рецепторы	[233] [234, 235] [236, 237] [238] [239]
Регуляция циркадных ритмов	AANAT	[138, 240]
Регуляция стероидогенеза	STARD1	[241, 242]
Регуляция синтеза нейротрансмиттеров	Тирозингидроксилаза Триптофангидроксилаза	[243, 244] [61, 245]
Регуляция глюкозного обмена	ChREBP AS160	[246] [166]
Регуляция белков цитоскелета	Тау белок LIMK киназа, SSH-1L фосфатаза HSPB6 Интегрин, паксиллин Талин кератины GFAP KIF1C кинезин	[247, 248] [249] [132, 250] [251] [252] [206, 253] [254] [255]
Регуляция цветения у растений	Hd3a	[256, 257]
Регуляция транспирации у растений	H ⁺ -АТФаза	[258, 259]
Регуляция импорта белков в митохондрии и хлоропласты	Белки-предшественники, HSP70 Tom34	[181, 182, 260] [195]
Взаимодействие с белками вирусов при инфицировании	Белок Е6 папилломавируса Белок W генипавируса Белок Рер68 аденовируса Белок X вируса гепатита Б Белок N коронавируса SARS Белок NS3 вируса Зика Белок NS1 вируса гриппа	[261, 262] [263] [264] [265] [266] [267] [268]
Взаимодействие с токсинами бактерий	ExoS и ExoT	[139, 269]

*Жирным шрифтом выделены белки, взаимодействие которых с 14-3-3 было исследовано в настоящей работе.

Ранее белки-партнеры 14-3-3 уже были классифицированы по принадлежности к разным семействам/функциям белков [78, 270] или по изоформам 14-3-3 [271]. На Рис. 13 показан наиболее актуальный результат анализа геной онтологии (GO) белков-партнеров 14-3-3, который показывает их функциональное разнообразие. Применение фильтра для извлечения из общего числа (2871) только белков-партнеров, чье взаимодействие с 14-3-3 было подтверждено более чем в одном исследовании, позволило сократить интерактом до 1202 партнеров. Далее проводилось сравнение с полным протеомом человека и теми GO категориями, которые были избыточно представлены в списке ($p < 0,01$).

Табл. 5. Число белков-партнеров у различных изоформ 14-3-3. *показано в порядке убывания на основе информации из всех курируемых баз данных (*HPRD* [272], *BioGRID* [273], *IntAct* [274], *DIP* [275] и *Mentha* [276]). Общее число – 2871 (весна 2019 года).

Название гена	Название белка	Идентификатор Uniprot	Число партнеров*
YWHAZ	14-3-3 дзета (ζ)	P63104	805
YWHAG	14-3-3 гамма (γ)	P61981	450
YWHAQ	14-3-3 тау (τ)	P27348	435
YWHAB	14-3-3 бета (β)	P31946	405
YWHAЕ	14-3-3 эпсилон (ϵ)	P62258	396
YWHAN	14-3-3 эта (η)	Q04917	193
SFN	14-3-3 сигма (σ)	P31947	187

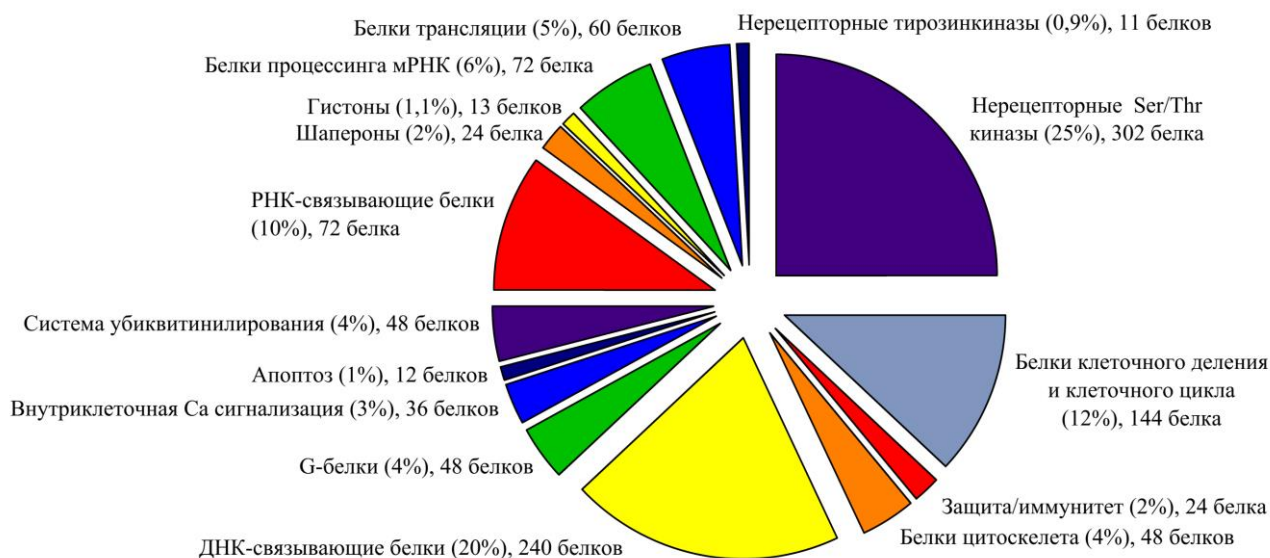


Рис. 13. Функциональное разнообразие белков-партнеров 14-3-3. В общей сложности 1202 белка, для которых показано взаимодействие с белками 14-3-3, были классифицированы по различным неперекрывающимся категориям GO (gene ontology). Для наглядности неклассифицированные белки не были включены в анализ. Приводятся как абсолютные числа, так и проценты для каждой категории от общего числа.

По сравнению с более ранними классификациями [78, 270], актуальное число белков-партнеров значительно увеличилось, а также появились новые функциональные категории. Три из них, показанные на Рис. 13, отсутствовали в предыдущих классификациях и, вероятно, будут активно исследованы в будущем. Например, вовлечение 14-3-3 в считывание модификаций гистонов указывает на прямое участие белков 14-3-3 в эпигенетическом контроле экспрессии генов [277]. Это перекликается с данными о том, что 14-3-3 опосредовано регулируют такие ПТМ как ацетилирование, фосфорилирование и метилирование – частые модификации белков гистонов [271]. Категория системы убиквитинилирования также не была выявлена ранее. Наконец, ранее не описанная категория иммунитета/защитных механизмов для белков, взаимодействующих с 14-3-3, также является интересным предметом будущих исследований. Стоит принять во внимание, что проведенный анализ еще не учитывает взаимодействий 14-3-3 с белками вирусов и других инфекционных агентов (Табл. 4). Они были обнаружены сравнительно недавно и, вероятно, представляют собой универсальный механизм взаимодействия патогенов с клетками хозяевами [278].

В нескольких исследованиях *in vitro* и *in vivo* были выявлены примеры специфичности изоформ 14-3-3 [241, 279]. Кроме того, показана специфическая для определенной фазы клеточного цикла экспрессия изоформ 14-3-3 [280] и специфическая регуляция протеинкиназ определенными изоформами 14-3-3 [281].

При классификации белков-партнеров по изоформам 14-3-3 с помощью методов, основанных на GO, оказалось, что каждая изоформа 14-3-3 может специализироваться в каких-то биологических процессах больше, чем в других [271]. Вероятно, предковый вариант 14-3-3 имел множество функций и взаимодействий, и каждая существующая изоформа 14-3-3 поддерживает только некоторые из них, с определенным перекрытием. Три из семи 14-3-3 человека имеют выраженную *субфункционализацию* (каждая изоформа семейства белков сохраняет одно подмножество своей первоначальной наследственной функции, но теряет другое). С точки зрения системной биологии, 14-3-3 ζ больше специализируется на трансляции белка и организации органелл, 14-3-3 ϵ больше специализируется на пролиферации клеток, а 14-3-3 γ доминирует в регуляции процессинга мРНК и сплайсинга РНК [271].

С точки зрения биохимии и структурной биологии, обширный интерактом 14-3-3 крайне слабо изучен (см. Табл. 6). Так, среди сотен обнаруженных комплексов 14-3-3 с различными белками, в базе данных PDB депонированы лишь ~100-150 пространственных

структур комплексов 14-3-3 с фосфопептидами (полученные методом PCA), многие из которых повторяются или довольно сильно похожи. Значительно меньше известно структур комплексов 14-3-3 с более длинными фрагментами белков-партнеров и, тем более, полноразмерных комплексов. Стоит отметить, что значительная доля охарактеризованных структур комплексов 14-3-3 с полноразмерными белками-партнерами имеют низкое разрешение, поскольку соответствующие гибридные модели, как правило, получены с использованием нескольких методов (Табл. 6).

Табл. 6. Степень изученности интерактома 14-3-3 (по данным на лето 2020 года).

Категория	Число	Примечания/примеры	Методы	Ссылки
Предсказанные партнеры	>2000	Число неуклонно растет	<i>In silico</i> и базы данных	[153, 282]
Экспериментально обнаруженные взаимодействия	сотни	Возможно, включают не прямые взаимодействия; слабые взаимодействия недопредставлены	Протеомные, аффинная очистка комплексов 14-3-3	[81, 283]
Комплексы 14-3-3 с пептидами	~150 ^a	p53, c-Raf, Tau, белки цитоскелета, ферменты метаболизма, и т.д.. Как правило, менее 10 остатков видно в структурных моделях. Например, в структуре PDB 4J6S из 43 остатков видно только 7 [284].	PCA	PDB
Модели структуры комплексов с 14-3-3 низкого разрешения	~10	Шибби Фосдуцин NTH1 ASK1 PMA2 RGS3 HSPB6 ARHGAP22 FOXO4 PI4KB Каспаза-2	PCA+ЯМР МУРР+ПДО+ЯМР МУРР+ПДО+СМС МУРР+ЯМР+ПДО+ВРФ ЭМ+PCA МУРР+ПДО+ВРФ МУРР+PCA МУРР+СМС ВРФ МУРР+PCA МУРР+ЯМР+ПДО+PCA	[150] [285, 286] [287] [288] [170] [236] [145] [289] [290] [291] [292]
Комплексы 14-3-3 с большими фрагментами белков	3-5	PMA2 (52 а.а.) (код PDB 2O98) Hd3a (165 а.а.) (код PDB 3AXY) ChREBP(21 а.а.) (код PDB 4GNT)	PCA PCA PCA	[170] [256] [293]
Комплексы 14-3-3 с полными белками-партнерами	7-9	AANAT (код PDB 1IB1) HSPB6 (код PDB 5LTW) NTH1 (код PDB 5N6N) EcoT (код PDB 6GNN) EcoS (коды PDB 6GN0, 6GN8) B-Raf (код PDB 6U2H) B-Raf (код PDB 6UAN) B-Raf/MEK1 (код PDB 6Q0J)* B-Raf/MEK1 (код PDB 6NYB)**	PCA PCA PCA PCA PCA PCA ЭМ ЭМ ЭМ	[163] [145] [294] [295] [295] [296] [297] [298] [298]

^a – включая похожие и идентичные комплексы. Сокращения методов: PCA – рентгеноструктурный анализ, МУРР – малоугловое рассеяние рентгеновских лучей, СМС – «сшивающая» масс-спектрометрия, ВРФ – времяразрешенная флуориметрия, ЭМ – электронная микроскопия, ПДО – протон-дейтериевый обмен, ЯМР – ядерный магнитный резонанс. *активное состояние тройного комплекса 14-3-3/B-Raf/MEK1 *автоингибированное состояние этого комплекса.

В последние 2-3 года наблюдается значительный прорыв в получении структур полных комплексов с участием 14-3-3, причем эти результаты публикуются в самых престижных научных изданиях (см. Рис. 14 и Табл. 6). Как уже отмечалось, *первая* структура комплекса 14-3-3 с AANAT была получена в 2001 году, а *второй* по счету стала структура, полученная в нашей работе и опубликованная в 2017 году. После этого в кратчайшие сроки (2017-2020 гг.) было опубликовано сразу несколько структур, причем часть из них была получена с помощью метода криоэлектронной микроскопии с разрешением, сопоставимым с таковым для некоторых кристаллографических структур (см. Рис. 14). Структура 14-3-3 с ExoS/T представляет собой комплекс с нефосфорилированным белком-партнером, все остальные структуры соответствуют комплексам 14-3-3 с фосфорилированными белками.

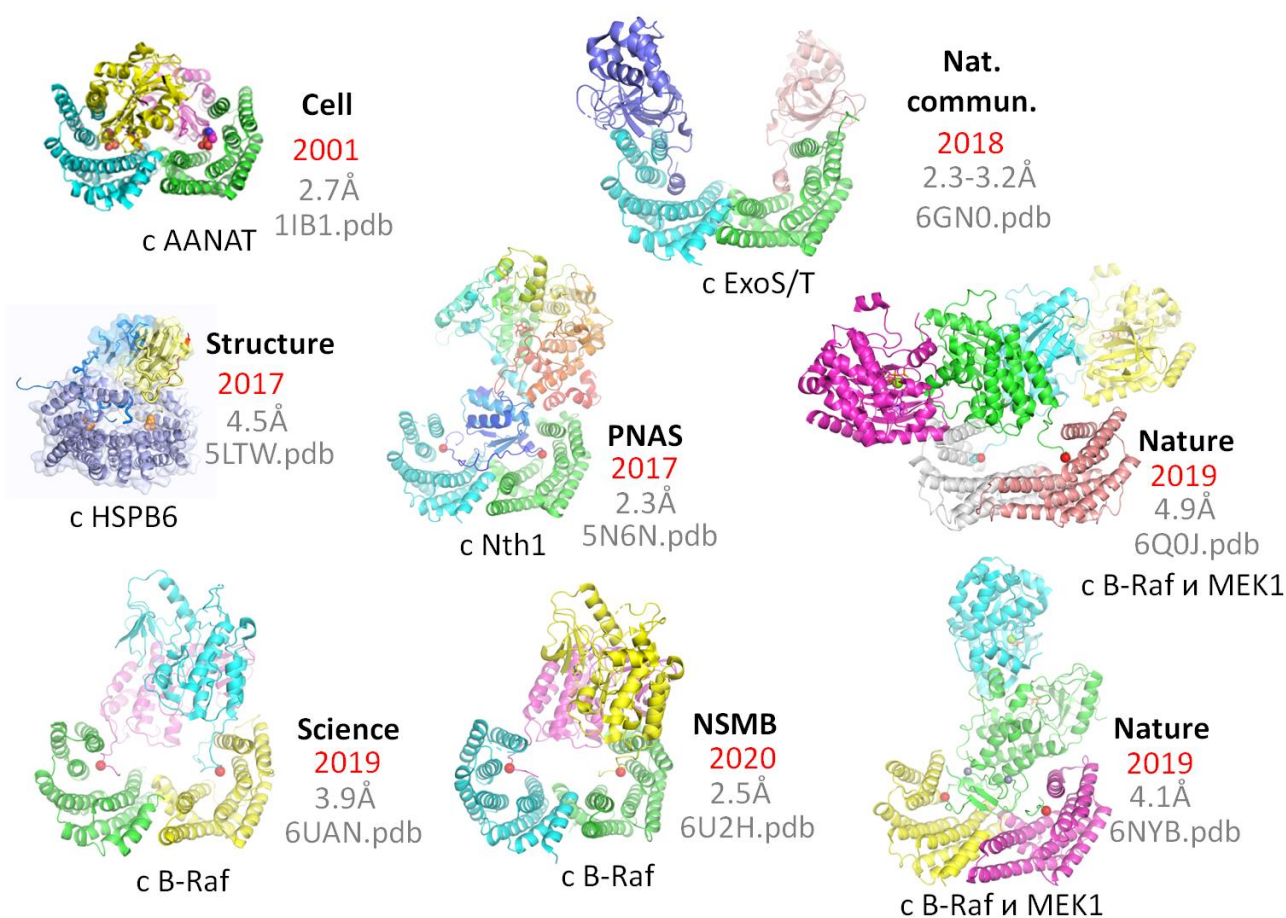


Рис. 14. Пространственные структуры полных комплексов 14-3-3 с белками-партнерами, полученные с помощью методов РСА и криоэлектронной микроскопии. Указано название журнала, где опубликованы структуры, а также год, разрешение и код PDB. Партнеры подписаны внизу каждой структуры. Для ExoS/T получено несколько структур с разным разрешением (указан диапазон), однако приведена наибольшая по размеру структура с ExoS с разрешением 3,2 Å. Все модели нарисованы с использованием координат, указанных в виде кодов PDB, в программе *PyMOL 2.20* (Schrödinger). Nat. Commun. – Nature communications, NSMB – Nature Structural and Molecular Biology, PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.

С учетом бурного развития методов структурной биологии, наблюдаемого в последние 5-10 лет, стоит ожидать стремительного роста количества публикаций с новыми структурными данными о комплексах 14-3-3 в самое ближайшее время. Тем не менее, количество охарактеризованных комплексов белков 14-3-3 остается не сопоставимо малым по сравнению с размером интерактома 14-3-3 (Табл. 6). Такая серьезная диспропорция подчеркивает, что исследователи находятся в самом начале пути к полному пониманию селективности амфипатических бороздок белков 14-3-3 при связывании огромного количества белков с отличающимися фосфорилированными последовательностями, и к тому, как белки 14-3-3 функционируют в масштабе системной биологии. Прежде чем окажется возможным с уверенностью предсказать, будет ли тот или иной субоптимальный по последовательности фосфопептид связываться с 14-3-3, необходимо накопление большого массива экспериментальных данных. Сложившаяся ситуация требует разработки новых подходов для облегчения получения комплексов 14-3-3 и их структурных исследований.

Расширение арсенала пространственных структур также абсолютно необходимо для разработки новых терапевтических подходов, основанных на модуляции белок-белковых взаимодействий с участием 14-3-3 [3, 162]. Помимо структурных исследований, необходима характеристика параметров и механизма взаимодействия 14-3-3 с белками-партнерами (стехиометрия, аффинность, области контакта белков, архитектура комплексов).

К сожалению, известные пространственные структуры комплексов 14-3-3 с белками-партнерами являются статическими и не несут ключевой информации о процессе формирования комплексов и иерархии взаимодействий различных структурных элементов в их составе, что тем не менее представляется важным с теоретической точки зрения. В литературе делаются только первые попытки исследовать этот вопрос с применением методов молекулярной динамики [282, 299]. Стоит ожидать развитие вычислительных подходов и дальнейшее их применение для такого рода задач.

Малый белок теплового шока HSPB6 – важный партнер белков 14-3-3

Данный раздел посвящен более подробному описанию одного из белков-партнеров, малого белка теплового шока HSPB6, взаимодействие которого с белками 14-3-3 было детально исследовано в настоящей работе.

Прежнее название белка HSPB6 – HSP20, или p20 – отражало его кажущуюся молекулярную массу ~20 кДа и было дано при первом описании в 1994 году [300]. Этот белок был изолирован совместно с другими малыми белками теплового шока (sHSP) – HSPB5 (α В-кристаллином) и HSPB1 (HSP27). Наряду с тремя другими членами семейства sHSP, а именно, HSPB1, HSPB5 и HSPB8, белок HSPB6 экспрессируется повсеместно [301, 302] и особенно высоких концентраций достигает в гладких и скелетных мышцах и в сердце [302-304]. Экспрессия HSPB6 (здесь и далее, B6) может варьироваться при разных физиологических условиях.

Так называемая шапероно-подобная активность, т.е. способность предотвращать агрегацию частично денатурированных или развернутых белков (см. Рис. 15), является общей для всех белков sHSP [305, 306]. Первые эксперименты *in vitro*, проведенные на B6 крысы, показали, что шапероно-подобная активность этого белка была ниже, чем активность α -кристаллина (со-полимер HSPB4 и HSPB5) [307]. Более поздние исследования на B6 человека показали, что в зависимости от природы модельного белка-субстрата, шапероно-подобная активность B6 может быть сопоставимой с таковой для α В-кристаллина [308, 309]. На клеточном уровне защитный эффект, вызванный сверхэкспрессией B6, был сравним с эффектом α В-кристаллина [310].

Последовательность B6 типична для sHSP и содержит консервативный α -кристаллиновый домен (АКД), фланкированный N- и C-концевыми структурно-разупорядоченными областями [311, 312]. B6 человека (UniProt O14558) имеет 160 аминокислотных остатков в длину и является одним из самых коротких среди sHSP (Рис. 16А). Все попытки кристаллизовать полноразмерный белок B6 оказались безуспешными, вероятно, из-за динамичности его N- и C-концевых сегментов [313]. В то же время укороченные фрагменты B6, содержащие АКД, были кристаллизованы, и их трехмерная структура оказалась сходной с аналогичными фрагментами других представителей sHSP [313-316]. Во всех структурах АКД состоит из шести (или семи) β -складок, упакованных в два слоя, образующих β -сэндвич. Два антипараллельных мономера B6 АКД взаимодействуют за счет контактов β 7-складок [313-316] в так называемом АПР регистре

(Рис. 16Б) [313], а $\beta 4$ и $\beta 8$ -складки образуют гидрофобные бороздки, которые могут быть заняты различными гидрофобными пептидами [313, 317]. Взаимодействия с гидрофобными $\beta 4/\beta 8$ бороздками по бокам АКД важны для олигомеризации, взаимодействия с другими белками и шаперонной активности белка В6.

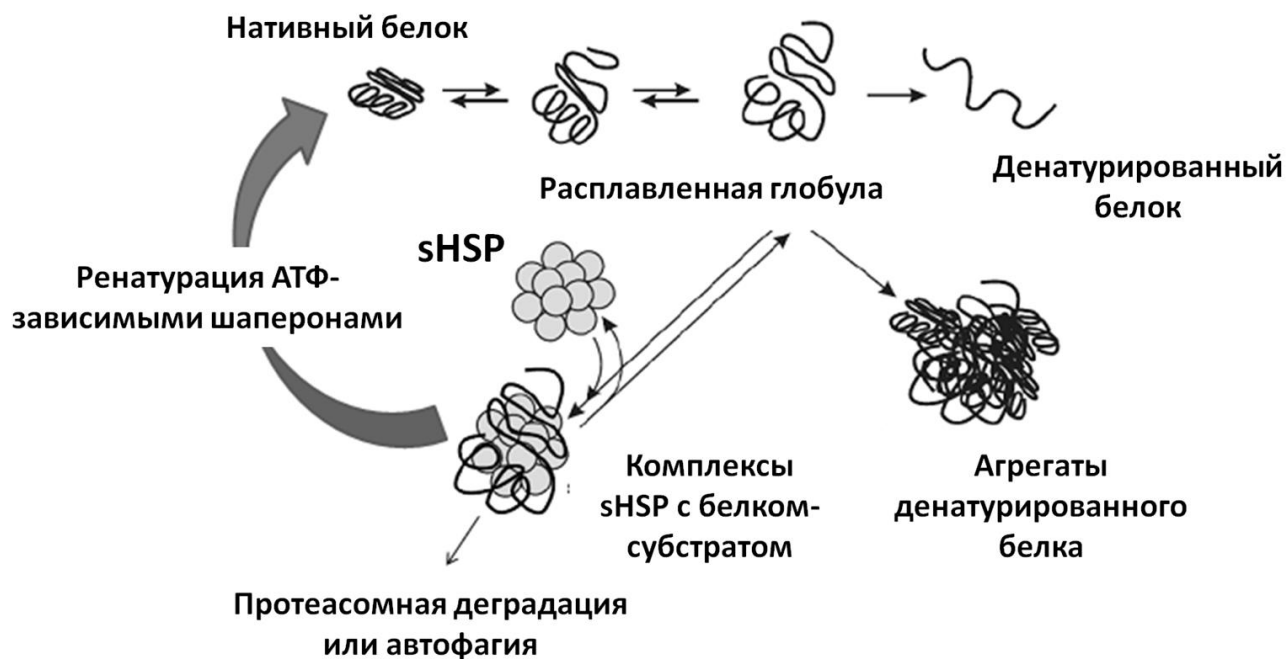


Рис. 15. Механизм функционирования малых белков теплового шока (sHSP), предотвращающих агрегацию денатурированных белков-субстратов. По данным [318], с изменениями.

Несмотря на отсутствие данных высокого разрешения, молекулярная структура полноразмерного В6 была успешно исследована с использованием комбинации малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) и рентгеноструктурного анализа (РСА) кристаллизованных фрагментов В6 (Рис. 16Б) [313]. Согласно такой гибридной модели, белок представляет собой димер АКД, фланкированный длинными гибкими N- и C-концевыми участками, занимающими широкий набор различных конформаций [313].

Данные об олигомерном состоянии белка В6 довольно противоречивы. Ранние исследования, проведенные на В6 крысы, показали, что этот белок образует динамичные олигомеры с молекулярной массой 43-67 и 300-470 кДа [300, 307]. Анализ неочищенного экстракта мышц с помощью гель-фильтрации или осаждения в градиенте плотности сахарозы позволил обнаружить В6 во фракциях с кажущейся молекулярной массой в диапазоне от 68 до 540 кДа [300, 319]. Увеличение внутриклеточной концентрации циклического АМФ сопровождалось смещением распределения В6 в сторону фракций с

меньшей молекулярной массой [319]. Вследствие этого, было высказано предположение, что фосфорилирование вызывает диссоциацию олигомеров В6 и, вероятно, могут влиять на взаимодействие В6 с белками-субстратами [4, 320, 321]. Предполагается, что В6 взаимодействует со многими белками, поэтому полученные на неочищенных экстрактах данные могут указывать, что фосфорилирование (или тепловой шок) влияют на стабильность гетерокомплексов, образованных В6, однако нельзя исключить и прямого влияния на олигомерное состояние самого В6.

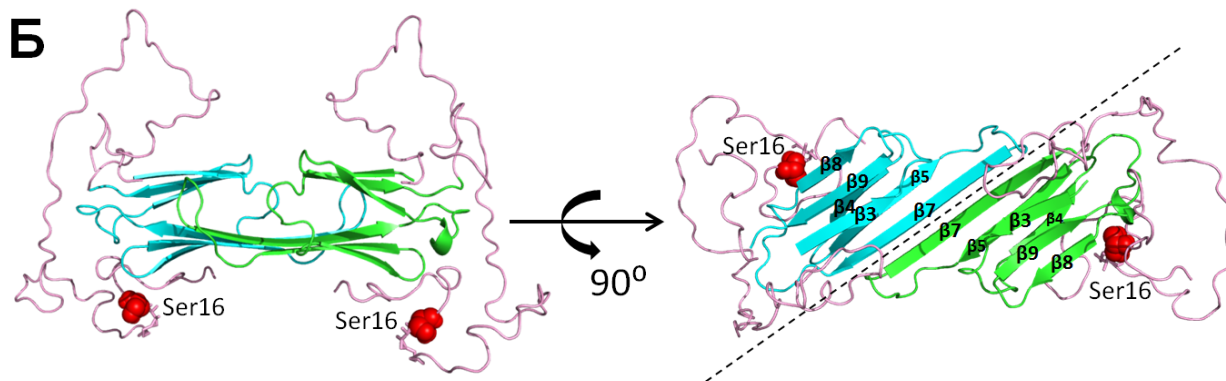
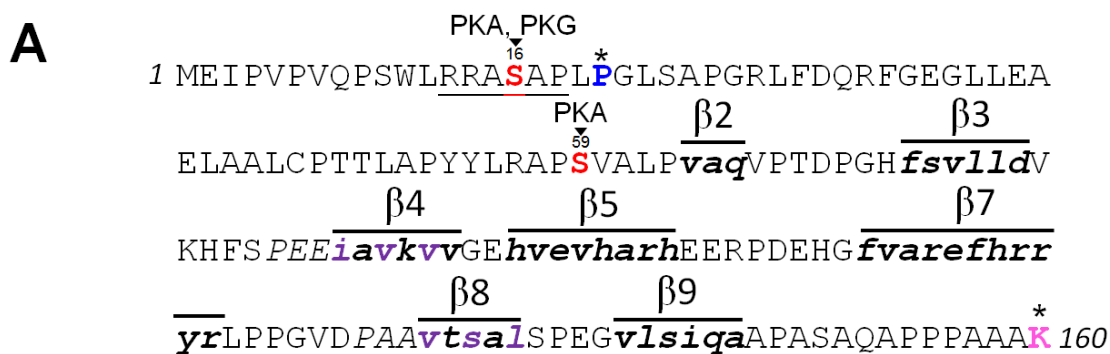


Рис. 16. А. Первичная структура белка HSPB6 человека. Остатки, участвующие в образовании β -складок, обозначены строчным курсивом, а предполагаемое расположение β -складок отмечено линиями над последовательностью. Остатки складок β 4 и β 8, участвующие в образовании гидрофобной бороздки, отмечены фиолетовым цветом. Остатки Ser16 и Ser59, фосфорилируемые циклонуклеотид-зависимыми протеинкиназами (протеинкиназы А (PKA) и G (PKG)), отмечены красным. Предполагаемая 14-3-3-связывающая последовательность, содержащая Ser16, подчеркнута. С-концевой Lys, подвергающийся ацетилированию (пурпурный), и Pro20, мутирующий при дилатационной кардиомиопатии (синий), отмечены звездочкой. Б. Гибридная модель структуры димера HSPB6 в растворе, показывающая β -складчатый димер α -кристаллинового домена, окаймленный гибкими концами. Только одна конформация концов модели 7AAA базы данных PEDB (<http://pedb.vib.be/query.php>) показана для наглядности. β -складки с соответствующими номерами для обоих мономеров отмечены голубым и зеленым, положение Ser16 отмечено красными сферами. Плоскость интерфейса димера HSPB6 показана пунктирной линией.

Образование крупных полидисперсных олигомеров, динамически обменивающихся мономерами, является типичным для представителей семейства sHSP, однако не соблюдается строго для всех его представителей. Например, белкам HSPB1, HSPB4 (α A-кристаллин) и HSPB5 (α B-кристаллин) свойственно образование крупных олигомеров, в которых димеры АКД контактируют за счет взаимодействия гибких N- и C-концов, а белки HSPB6 и HSPB8 образуют, в основном, малые олигомеры (Рис. 17). Неспособность образовывать стабильные крупные олигомеры может быть связана с отсутствием у В6 консервативной С-концевой последовательности (I/V/L)-X-(I/V/L), которая участвует во взаимодействии димеров АКД и образовании больших олигомеров у α A- и α B-кристаллинов [314, 317, 322]. Однако при очень высокой концентрации В6 человека все же демонстрирует некоторую самоассоциацию [313]. Принимая во внимание высокое содержание В6 в определенных тканях и условия краудинга внутри клетки, еще больше повышающие его эффективную концентрацию, нельзя исключать, что *in vivo* белок В6, так же как и другие представители sHSP, может образовывать гомоолигомерные комплексы более высокого порядка. Очевидно, что необходимы дальнейшие исследования олигомерного состояния белка В6 в различных условиях, а также влияния на него посттрансляционных модификаций.

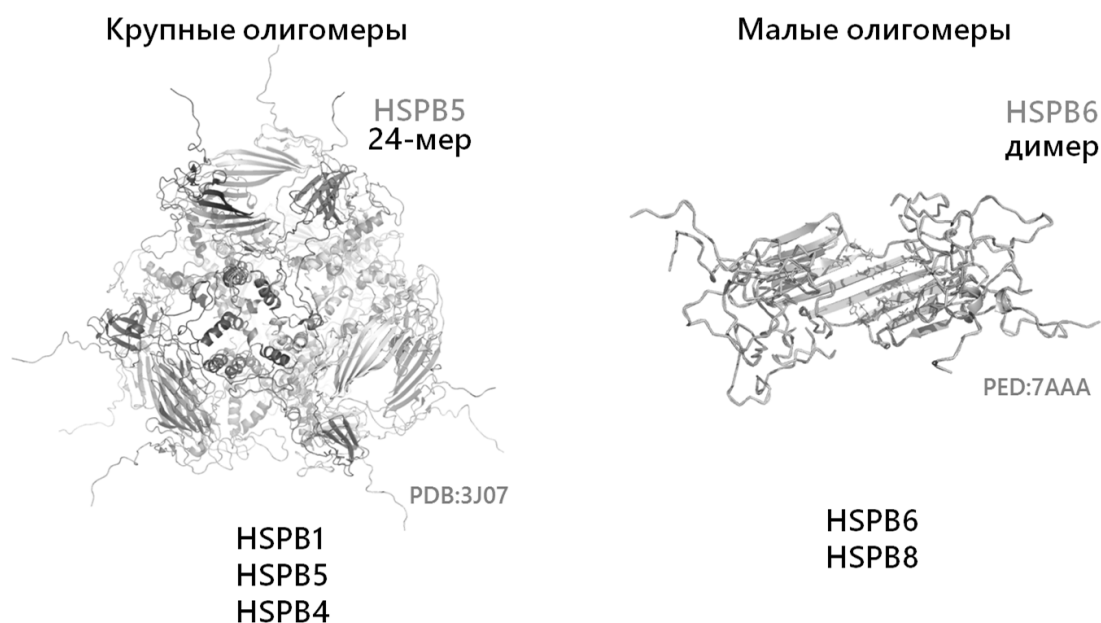


Рис. 17. Олигомерное состояние малых белков теплового шока (sHSP). Для sHSP типична способность образовывать крупные олигомеры с динамичной структурой (слева), однако некоторые представители преимущественно представлены в виде малых олигомерных форм (справа).

Пожалуй, наиболее важной модификацией белка В6 является фосфорилирование. Остаток Ser59, консервативный в В6 человека, макаки, быка, крысы и мыши,

фосфорилируется *in vitro* с помощью сАМР-зависимой протеинкиназы [323] (Рис. 18). Недавно было обнаружено его фосфорилирование в скелетных мышцах человека [324], однако роль такой модификации остается не до конца понятной.

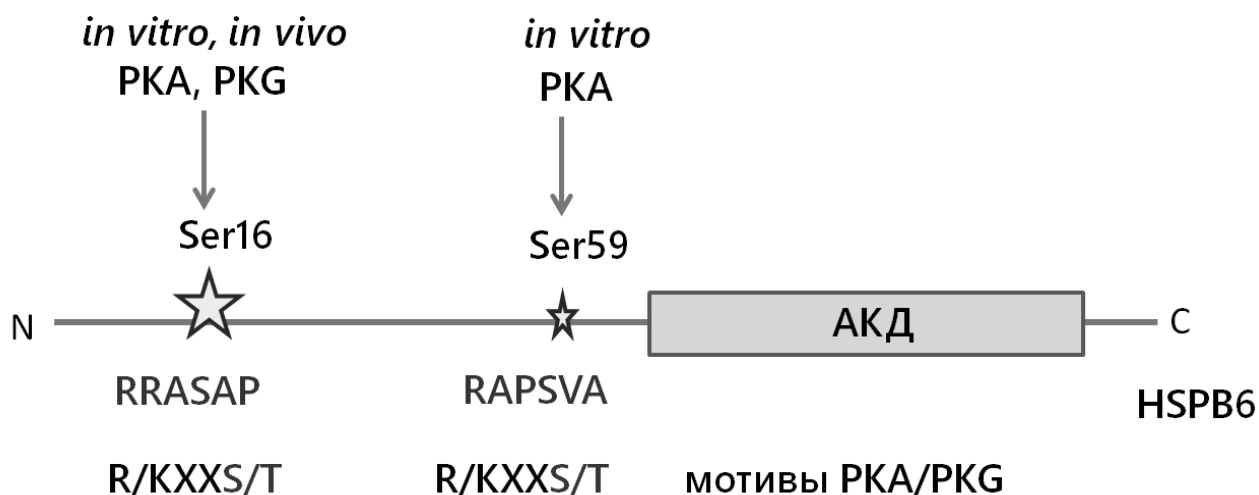


Рис. 18. Схема фосфорилирования белка HSPB6 человека под действием циклонуклеотид-зависимых протеинкиназ.

Было показано, что участок, содержащий Ser16, с первичной структурой, строго консервативной в В6 человека, быка, крысы и мыши, эффективно фосфорилируется с помощью циклонуклеотид-зависимых протеинкиназ PKA и PKG как *in vitro*, так и *in vivo* [323, 325, 326] (Рис. 18), что сопровождается расслаблением гладких мышц трахеи и сонной артерии [323, 325, 326]. Расслабление мускулатуры, вызванное фосфорилированием В6, по-видимому, не зависит от уровня фосфорилирования регуляторных легких цепей миозина [326, 327]. Это означает, что фосфорилированный белок В6 каким-то образом влияет на актиновые филаменты или модулирует их взаимодействие с фосфорилированным миозином, вызывая расслабление.

Были выдвинуты две гипотезы, пытающиеся объяснить молекулярный механизм релаксации, индуцированной фосфорилированием белка В6. Согласно первой, в структуре В6 имеется пептид, гомологичный ингибиторному пептиду тропонина I [326]. Фосфорилирование индуцирует транслокацию В6 к актиновым филаментам, и соответствующий пептид ингибирует взаимодействие фосфорилированного миозина с актином, подобно тропонину I. Таким образом, фосфорилирование В6, индуцированное активацией протеинкиназ [326], гипоксией [328] или предварительной тепловой обработкой [329] приводят к инактивации областей актиновых филаментов, содержащих фосфорилированный В6. Согласно второй гипотезе, нефосфорилированный В6

взаимодействует с F-актином и α -актинином и тем самым стабилизирует актиновый цитоскелет, обеспечивая эффективное сокращение. Фосфорилированный В6 диссоциирует от актинового цитоскелета, вызывая разборку актиновых филаментов, их диссоциацию от α -актинина, дестабилизацию и реорганизацию цитоскелета, что приводит к расслаблению гладких мышц [330-332].

Проникающий пептид В6, содержащий фосфорилированный остаток Ser16 в мотиве RRAS¹⁶APLP, индуцировал разборку стрессовых фибрилл актина и комплексов фокальной адгезии в 3Т3 фибробластах [250]. Поскольку этот мотив идеально совпадает с последовательностями, узнаваемыми белками 14-3-3, было предположено, что фосфопептид В6 взаимодействует с 14-3-3 и вытесняет фосфорилированный белок кофилин из его комплекса с 14-3-3. Согласно этой гипотезе, вытесненный фосфорилированный кофилин подвергается быстрому дефосфорилированию, катализируемому фосфатазой Slingshot (SSH-1L), что приводит к разборке фибриллярного актина и вызывает отделение актиновых филаментов от комплексов фокальной адгезии [250].

Оказалось, что полноразмерные белки В6 и 14-3-3 действительно образовывали прочные комплексы *in vitro*, что наблюдалось только в случае фосфорилированного варианта В6 [132]. По всей видимости, взаимодействие этих белков тонко регулируется. Например, точечные мутации, имитирующие фосфорилирование 14-3-3 ζ , изменяли эффективность его взаимодействия с фосфорилированным В6 [333]. Несмотря на то, что взаимодействие белков В6 и 14-3-3 было убедительно продемонстрировано, до нашей работы механизм образования этого комплекса и его структура оставались абсолютно не исследованными.

Механизм расслабления гладких мышц, индуцированный фосфорилированным В6, остается загадочным до сих пор. Как уже упоминалось, вначале было высказано предположение, что фосфорилированный В6 конкурирует с фосфорилированным кофилином за взаимодействие с 14-3-3 [4, 250], что приводит к высвобождению кофилина, его дефосфорилированию и разборке актиновых филаментов, вызывая расслабление гладких мышц. Эта гипотеза, основанная на работе [334], предполагала прямое прочное взаимодействие фосфорилированного кофилина и 14-3-3. Однако недавно было показано, что фосфорилированный кофилин не способен прочно взаимодействовать с белками 14-3-3 и, соответственно, не может напрямую конкурировать с фосфорилированным В6 за взаимодействие с 14-3-3 [335]. Это означает, что должны быть другие механизмы, лежащие в основе эффекта релаксации, вызванного образованием комплекса фосфорилированного В6 и 14-3-3.

Например, более эффективным может быть способ регуляции, при котором фосфорилированный В6 вытесняет не сам кофилин, а ферменты, регулирующие его фосфорилированное состояние (Рис. 19). Реалистичным кандидатом представляется фосфатаза Slingshot (SSH-1L), фосфорилированная форма которой взаимодействует с 14-3-3 и за счет этого инактивируется [336, 337]. Вытеснение этой фосфатазы из комплекса с 14-3-3 под действием фосфорилированного В6 могло бы приводить к ее активации, дефосфорилированию кофилина и фрагментации актиновых филаментов, в конечном счете, вызывая расслабление гладких мышц [335, 337, 338]. Другими ферментами, вытесняемыми из комплекса с 14-3-3 под действием В6, и вследствие этого, инактивируемыми, могли бы быть протеинкиназы, фосфорилирующие кофилин, такие как LIMK или TESK1 [249, 338].

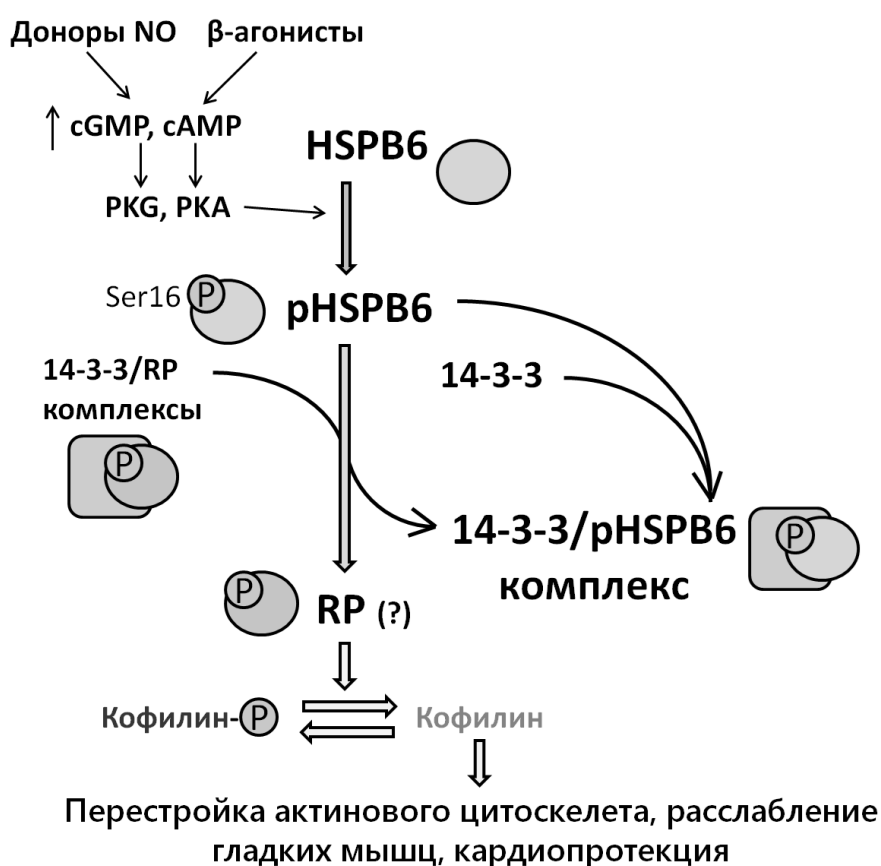


Рис. 19. Гипотетическая модель участия белка HSPB6 в регуляции сокращения гладких мышц. Увеличение концентрации циклических нуклеотидов внутри клеток активирует протеинкиназы, которые фосфорилируют HSPB6 по остатку Ser16. Фосфорилированный HSPB6 связывается с 14-3-3 и вытесняет различные регуляторные белки (RP) из их комплексов с 14-3-3. Регуляторные белки (например, фосфатаза Slingshot или протеинкиназы LIMK и TESK1), диссоциировавшие от 14-3-3, смещают равновесие в сторону дефосфорилированного кофилина, который разбирает актиновый цитоскелет, приводя к расслаблению гладких мышц. Стабильность комплекса между фосфорилированным HSPB6 и 14-3-3, предположительно, определяет эффективность такой регуляции и представляется перспективной мишенью для создания миорелаксантов.

Таким образом, взаимодействие фосфорилированного полноразмерного В6 или его фосфорилированного пептида с 14-3-3 стоит в центре регуляции расслабления гладкой мускулатуры и ряда других физиологических процессов, а потому представляется крайне перспективной мишенью для фармакологического действия. Флуоресцентно меченный фосфорилированный пептид В6 был успешно использован для крупномасштабного скрининга низкомолекулярных соединений, которые потенциально могут быть использованы для индукции расслабления гладких мышц дыхательных путей при астматических приступах [339]. Был разработан эффективный метод получения препаративных количеств проникающей в клетки фосфорилированной формы белка В6 [340]. Было показано, что фосфорилированный пептид или фосфорилированный полноразмерный В6 эффективно снимают спазм сегментов подкожной вены человека [341]. Проникающий фосфорилированный пептид В6 предотвращает спазм сосудов без существенного влияния на пролиферацию клеток и, следовательно, представляется перспективным для реконструкции периферических сосудов [342].

Фосфопептиды В6 были успешно использованы против чрезмерного образования рубцов [343], для расслабления гладких мышц дыхательных путей [340, 344], для предотвращения вазоспазма пупочной артерии человека [340] и субарахноидального кровоизлияния, вызванного медленным спазмом сосудов [345]. Несмотря на эффективность в доклинических исследованиях, насколько известно, ни один из вариантов пептидов В6, включая запатентованный вариант AZX100® (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB06323>) [343], не прошел дальше второй фазы клинических испытаний (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00811577>).

Удивительно, но до начала нашей работы в литературе отсутствовало понимание структурных основ взаимодействия фосфопептидов В6 и, тем более, полноразмерного В6 с белками 14-3-3, что требовало тщательного изучения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. МАТЕРИАЛЫ

Базовые компоненты буферных растворов (HEPES, TRIS, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , Na_2HPO_4), соли (NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, пирофосфат натрия, сульфат натрия), кислоты (соляная, уксусная, фосфорная), щелочи (KOH , NaOH), спирты (этанол, изопропанол, глицерин) и пр. (ЭДТА, мочевины, гуанидин гидрохлорид, глицерол-1-фосфат, глицерол-2-фосфат), использованные в работе, были наивысшей доступной категории, от компаний Sigma (США), Panreac (Испания), Fluka (Германия), Хеликон (Россия), Реахим (Россия). Все растворы готовили на дистиллированной воде, прошедшей дополнительную очистку на системе Barnstead (США) до 18,1-18,3 МΩ/см (Milli-Q).

1,5-I-AEDANS и ТМАО были куплены в компании Sigma-Aldrich (США). Бис-АНС был куплен в компании Invitrogen (США). ИПТГ и ДТТ были куплены в компании Хеликон (Россия). Фузикоцин (Fc) был любезно предоставлен профессором д.б.н. А.В. Бабаковым.

Олигонуклеотидные последовательности (Табл. 7), использованные в работе при клонировании и сайт-направленном мутагенезе, были заказаны в компании Евроген (Россия). Кодированные последовательности химер 14-3-3ζ с фосфорилируемыми пептидами белков BAD (Рис. 21) и 18E6 (Рис. 20), содержащие необходимые модификации, с фланкирующими последовательностями, содержащими сайты эндонуклеаз рестрикции, были оптимизированы по кодонному составу для экспрессии в *Escherichia coli* и синтезированы в компании Integrated DNA Technologies (Айова, США, <https://eu.idtdna.com/pages>) в виде двуцепочечных ДНК фрагментов типа gblocks.

Бактериальные плазмиды, несущие кДНК всех семи изоформ 14-3-3 человека, укороченных с С-конца [169], были любезно предоставлены проф. К.Оттманном (Технический Университет г. Эйнховен, Нидерланды). Плазмиды, кодирующие фьюжн конструкции MBP-14-3-3, были получены в рамках данной работы в лаборатории проф. Ж.Траве (Страсбург, Франция). Плазмиды, кодирующие полноразмерные 14-3-3ζ [217] и 14-3-3γ [132], а также белки HSPB5 [309] и HSPB6 [308] дикого типа были любезно предоставлены проф. чл-корр. РАН Н.Б.Гусевым (биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова). Плазмида, кодирующая каталитически активную субъединицу мышинной РКА [346], была предоставлена проф. С. Тейлор (Университет Калифорнии, Сан Диего). Плазмиды H-MBP-3C и 3C протеазы [347], а также интактные вектора pACYCduet-1 и CDFduet-1 были любезно предоставлены проф. А.А.Антсоном (Йоркская структурно-

биологическая лаборатория, Йорк, Великобритания). Плазмиды, кодирующие B6 АКД и его фрагменты 57-160 и 1-149 в виде фьюжн конструкций с SUMO [313, 348], были любезно предоставлены проф. С.В.Стрелковым (Католический Университет г. Лёвен, Бельгия). Плаزمида, кодирующая липид-связывающий домен белка STARD1 (остатки 62-285) [349] была любезно предоставлена доктором Х. Босе (Медицинский факультет Университета Мерсера, США). Плазмида бестаговой зародышевой изоформы Тау белка человека (352 остатка) была получена нами в предыдущей работе [217].

Табл. 7. Олигонуклеотиды, использованные в работе в качестве праймеров для ПЦР.

Название праймера	Последовательность 5'→3'
T7 forward	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 reverse	CGGGCTTGTAGCAGCCG
MBP-forward	ACAACAACCTCGGGATCGAG
HMBP3C-reverse	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
STAR66 forward	ATATAGGATCCACTCTCTACAGTGACCAG
pQE30 reverse	CATTACTGGATCTATCAACAGGAG
STAR53 forward	TATAGGATCCAGGAGGAGTCTCCCTGCTGGGAAGCAGGCTCGAGGAACTCTCTACAGTGACCAGG
STAR46 forward	ATATAGGATCCACTTGGATTAATCAAGTTAGGAGGAGGGCTTCCCTGCTGGGAAGC
CH1 reverse	ATATCTCGAGTCACAACGGGGCGCTAGCGCGGCGCAGGGATCCCCGATCCCGTCCACAGTGTACG
CH2 reverse	ATATCTCGAGTCATGCTTGAGCAGGATCACTAGCGCGGCGCAG
CH3 reverse	ATATCTCGAGTCAACCACAACCGCTATTGCGGCGCAGGGATC
CH4 reverse	ATATCTCGAGTCAACGAGATCCCAGCAGGCTGCTGCGGCGCAGGGATC
CH5 reverse	ATATCTCGAGTCAAGCCAGCACACAGGTGGAGCCGCGGCGCAGGGATC
B6chim forward	ATATAAGATCTTTGCGCCGCGCCTCGGCC
B6-S16D forward	GCCGCGCCGACGCCCGTTGC
7NT-B6 forward	ATATACATATGGTACAACCGTCTTGGCTACGC
153CT-B6 reverse	ATTAACCTCGAGCTAGGCCTGTGTGACGCTG
clu1-AAA-forward	ATCAGCGCAGCAGCGATGCCACC
clu3-AAA-reverse	GGCCCTGTGCTGCCGATCCCTC
Zeta-S58E reverse	CGACCCTCCATTCTGACCTACG
Zeta-MMW reverse	CTCAGCCTGCCGCTGCTGTTGGCCTTCTGAACCAGCTATTTTATC
Zeta-WWM reverse	CTTAGCTCCGTCTGAATGTTCTCTCTGTCTCGAGC

Пептиды, использованные в работе (Табл. 8), были либо генетически кодированы в составе химерных конструкций, либо синтезированы с применением технологии твердофазного синтеза (Fmoc), а затем очищены с помощью обращенно-фазовой (C18) ВЭЖХ в компаниях Severn Biotech (Великобритания) и Proteogenix (Франция).

Большая часть белков, использованных в работе, была получена в рекомбинантном виде в результате суперэкспрессии в клетках *E.coli* (Табл. 9, Табл. 10 и Табл. 11). Некоторые белки были выделены из природных источников. Субфрагмент 1 миозина был получен Д.С.Логвиновой при химотрипсинолизе миозина скелетных мышц кролика, по методике, описанной ранее [350]. Киназа гликогенфосфорилазы (PhK) из скелетных мышц кролика

была выделена в лаборатории проф. д.х.н. Б.И.Курганова по методике, описанной в ранних работах [351-353]. Дрожжевая алкогольдегидрогеназа (АДГ) и инсулин поджелудочной железы быка были куплены в компании Sigma-Aldrich. Лизоцим куриных яиц был куплен в компании Roche. Щелочная фосфатаза FastAP была произведена Thermo Fisher Scientific (США).

Для молекулярно-биологической части работы (клонирование и экспрессия белков) использовались клетки штаммов *E.coli* DH5 α , DH10 β , BL21(DE3), C41(DE3), Rosetta(DE3)pLysS.

Табл. 8. Пептиды, использованные в работе.

Пептид	Белок, сегмент	Описание
EIPVPVQPS	HSPB6, 2-10	синтетический
RRApS ¹⁶ APLP	HSPB6, 13-20	синтетический
WLRRApS ¹⁶ APLPGLK	HSPB6, 11-23	синтетический
SSRTRREpT ¹⁴⁹ QL-COOH	p16E6, 142-151	синтетический
SSRTRRET ¹⁴⁹ QL-COOH	16E6, 142-151 (нефосфорил.)	синтетический
RLQRRREpT ¹⁵⁶ QV-COOH	p18E6, 149-158	синтетический
RLQRRRET ¹⁵⁶ QV-COOH	18E6, 149-158 (нефосфорил.)	синтетический
LRRApS ¹⁶ APL	HSPB6, 12-19	в составе химеры CH1
RRApS ⁶⁴⁰ DPAQA	Gli1-3, 637-645	в составе химеры CH2
LRRNpS ²⁰⁵ GC-COOH	AANAT, 201-207	в составе химеры CH3
RRSpS ⁵⁷ LLGSR	STARD1, 54-62	в составе химеры CH4
RRGpS ¹⁹⁵ TCVLA	STARD1, 192-200	в составе химеры CH5
SRHSpS ⁷⁵ YPAGTE	BAD, 71-81	в составе химеры CH6
RRREpT ¹⁵⁶ QV-COOH	18E6, 152-158	в составе химеры CH7

MDKNELVQKAKLAEQAERYDDMAACMKSVTEQGAELSNEERNLLSVAYK
 NVVGARRS^{S58A}AWRVVSSIEQKTEGAEEKQQMAREYREKIETELRDICNDVL
 SLLEKFLIPNASQAESKVFYLLKMKGDYRYLAEVAAGDDKKGIVDQSQQ
 AYQEAFEIS^{Clu2}AAAMQPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNSPEKACSLAKTAF
 DEAIAELDTLSEESYKDSTLIMQLLRDNLTLTWT^{линкер}gsgg^{BAD 71-81}SRHSSYPAGTE
 ★

Рис. 21. Белковая последовательность химеры 14-3-3ζ с пептидом BAD, синтезированная в компании Integrated DNA Technologies (<https://eu.idtdna.com/pages>) в виде последовательности ДНК (gblocks). Отмечены основные элементы, звездочкой отмечен участок фосфорилирования РКА. S58A – замена, предотвращающая фосфорилирование, Clu2 – кластер замен исходных аминокислотных остатков на остатки аланина для снижения поверхностной энтропии, BAD 71-81 – фосфорилируемый пептид в составе BAD человека.

гис-таг ^{3C сайт}
 ME^{гис-таг}НННННLEVL^{3C сайт}FQ/GPHMDKNELVQKAKLAEQAERYDDMAACMKSVTE
 QGAELSNEERNLLSVAYKNVVGARRS^{S58A}AWRVVSSIEQKTEGA^{Clu1}AAAQQMAR
 EYREKIETELRDICNDVLSLLEKFLIPNASQAESKVFYLLKMKGDYRYL
 AEVAAGDDKKGIVDQSQQAYQEAFEIS^{Clu2}AAAMQPTHPIRLGLALNFSVFY
 YEILNSPEKACSLAKTAFDEAIAELDTLSEESYKDSTLIMQLLRDNLT
^{линкер} WTgggg^{18E6}RRRETQV#
 ★

Рис. 20. Белковая последовательность химеры 14-3-3ζ с пептидом 18E6, синтезированная в компании Integrated DNA Technologies (<https://eu.idtdna.com/pages>) в виде последовательности ДНК (gblocks). Отмечены основные элементы, звездочкой отмечен участок фосфорилирования РКА. S58A – замена, предотвращающая фосфорилирование, Clu1 и Clu2 – кластеры замен исходных аминокислотных остатков на остатки аланина для снижения поверхностной энтропии, 18E6 – фосфорилируемый С-концевой (#) пептид в составе онкобелка Е6 штамма 18 папилломавируса человека.

Табл. 9. Белки 14-3-3, использованные в работе.

Белок	Описание	Организм	Плазмида	Устойчивость к антибиотикам	Расчетная масса белкового продукта (после отщепления тага, если есть), кДа
14-3-3ζ	полноразмерный бестаговый (1-245)	человек	pET21	ампициллин	27,7
MBP-14-3-3ζ	Полноразмерный, с MBP на N-конце	человек	pETxM1	канамицин	72,7
14-3-3ζ S58E	псевдофосфорилированный мутант (1-245)	человек	pET21	ампициллин	27,8
14-3-3ζm (WMW)	мономерный мутант ¹² LAE ¹⁴ → ¹² QQR ¹⁴ (1-245)	человек	pET21	ампициллин	28,0
14-3-3ζm S58E (ζmS58E)	мономерный мутант ¹² LAE ¹⁴ → ¹² QQR ¹⁴ , несущий замену S58E, имитирующую фосфорилирование (1-245)	человек	pET21	ампициллин	28,0
14-3-3ζ MMW	мономерный мутант E5K, ¹² LAE ¹⁴ → ¹² QQR ¹⁴ (1-245)	человек	pET21	ампициллин	28,0
14-3-3ζ MMM	мономерный мутант E5K, ¹² LAE ¹⁴ → ¹² QQR ¹⁴ , ⁸² YREKIE ⁸⁷ → ⁸² QRENIQ ⁸⁷ (1-245)	человек	pET21	ампициллин	27,9
14-3-3ζ WMM	мономерный мутант, ¹² LAE ¹⁴ → ¹² QQR ¹⁴ , ⁸² YREKIE ⁸⁷ → ⁸² QRENIQ ⁸⁷ (1-245)	человек	pET21	ампициллин	27,9
14-3-3ζΔC	без C-конца (остатки 1-230), гис-таг на N-конце, отщепляемый TEV	человек	pProEX	ампициллин	29,5 (26,7)
14-3-3γ	полноразмерный бестаговый (1-247)	человек	pET21	ампициллин	28,3
MBP-14-3-3γ	Полноразмерный, с MBP на N-конце	человек	pETxM1	канамицин	73,3
14-3-3γΔC	без C-конца (остатки 1-230), гис-таг на N-конце, отщепляемый TEV	человек	pProEX	ампициллин	30,7 (27,8)
14-3-3ε	полноразмерный, гис-таг на N-конце, отщепляемый TEV (1-255)	человек	pRSET-A	ампициллин	32,5 (29,3)
MBP-14-3-3ε	Полноразмерный, с MBP на N-конце	человек	pETxM1	канамицин	74,1
14-3-3εΔC	без C-конца (остатки 1-232), гис-таг на N-конце, отщепляемый TEV	человек	pProEX	ампициллин	29,8 (27,0)
14-3-3βΔC	без C-конца (остатки 1-232), гис-таг на N-конце, отщепляемый TEV	человек	pProEX	ампициллин	29,9 (27,0)
MBP-14-3-3β	Полноразмерный, с MBP на N-конце	человек	pETxM1	канамицин	73,0
14-3-3ηΔC	без C-конца (остатки 1-235), гис-таг на N-конце, отщепляемый TEV	человек	pProEX	ампициллин	30,6 (27,8)
MBP-14-3-3η	Полноразмерный, с MBP на N-конце	человек	pETxM1	канамицин	73,2
14-3-3τΔC	без C-конца (остатки 1-230), гис-таг на N-конце, отщепляемый TEV	человек	pProEX	ампициллин	29,7 (26,7)
MBP-14-3-3τ	Полноразмерный, с MBP на N-конце	человек	pETxM1	канамицин	72,8
14-3-3σΔC	без C-конца (остатки 1-231), бестаговый	человек	pET23	ампициллин	26,1
14-3-3σΔC	без C-конца (остатки 1-231), бестаговый	человек	CDFduet1	стрептомицин	26,1
14-3-3σΔC Clu1	без C-конца (остатки 1-231), гис-таг на N-конце, отщепляемый 3С; замены ¹⁵⁹ ККЕ ¹⁶¹ → ¹⁵⁹ ААА ¹⁶¹	человек	pET28	канамицин	28,0 (25,9)
14-3-3σΔC Clu3	без C-конца (остатки 1-231), гис-таг на N-конце, отщепляемый 3С; замены ⁷⁵ ЕЕК ⁷⁷ → ⁷⁵ ААА ⁷⁷	человек	pET28	канамицин	27,7 (25,6)
MBP-14-3-3σ	Полноразмерный, с MBP на N-конце	человек	pETxM1	канамицин	72,8

Табл. 10. Химеры на основе белков 14-3-3, использованные в работе.

Белок	Описание	Организм	Плазмида	Устойчивость к антибиотику	Расчетная масса белкового продукта (после отщепления тага, если есть), кДа
Химера СН1	14-3-3σΔC, несущая гис-таг на N-конце, отщепляемый 3C, замены ⁷⁵ EЕК ⁷⁷ → ⁷⁵ ААА ⁷⁷ , слитая с фосфопептидом В6(12-19) через линкер GSGS	человек	pET28	канамицин	29,2 (27,4)
Химера СН2	14-3-3σΔC, несущая гис-таг на N-конце, отщепляемый 3C, замены ⁷⁵ EЕК ⁷⁷ → ⁷⁵ ААА ⁷⁷ , слитая с фосфопептидом Gli(637-645) через линкер GSGS	человек	pET28	канамицин	29,4 (27,6)
Химера СН3	14-3-3σΔC, несущая гис-таг на N-конце, отщепляемый 3C, замены ⁷⁵ EЕК ⁷⁷ → ⁷⁵ ААА ⁷⁷ , слитая с фосфопептидом ААNAT(201-207) через линкер GSGS	человек	pET28	канамицин	29,1 (27,3)
Химера СН4	14-3-3σΔC, несущая гис-таг на N-конце, отщепляемый 3C, замены ⁷⁵ EЕК ⁷⁷ → ⁷⁵ ААА ⁷⁷ , слитая с фосфопептидом STARD1(54-62) через линкер GSGS	человек	pET28	канамицин	29,5 (27,6)
Химера СН5	14-3-3σΔC, несущая гис-таг на N-конце, отщепляемый 3C, замены ⁷⁵ EЕК ⁷⁷ → ⁷³ ААА ⁷⁵ , слитая с фосфопептидом STARD1(192-200) через линкер GSGS	человек	pET28	канамицин	29,4 (27,6)
Химера СН6	14-3-3ζΔC, несущая гис-таг на N-конце, отщепляемый 3C, замены S58A, ¹⁵⁷ ККЕ ¹⁵⁹ → ¹⁵⁷ ААА ¹⁵⁹ , слитая с фосфопептидом ВAD(71-81) через линкер GSGG	человек	pET28	канамицин	29,5 (27,4)
Химера СН7	14-3-3ζΔC, несущая гис-таг на N-конце, отщепляемый 3C, замены S58A, ⁷³ ЕКК ⁷⁵ → ⁷³ ААА ⁷⁵ , ¹⁵⁷ ККЕ ¹⁵⁹ → ¹⁵⁷ ААА ¹⁵⁹ , слитая с фосфопептидом 18Е6(152-158) через линкер GGGG	человек	pET28	канамицин	29,2 (27,2)
14-3-3-В6 химера	14-3-3σΔC, несущая гис-таг на N-конце, отщепляемый 3C, замены ⁷⁵ EЕК ⁷⁷ → ⁷⁵ ААА ⁷⁷ , слитая с белком В6(12-153) через линкер GSGS	человек	pET28	канамицин	43,8 (41,7)

Табл. 11. Другие рекомбинантные белки, использованные в работе.

Белок	Описание	Организм	Плазмида	Устойчивость к антибиотику	Расчетная масса белкового продукта (после отщепления тага, если есть), кДа
HSPB6 (B6)	полноразмерный бестаговый (1-160)	человек	pET23	ампициллин	17,1
HSPB6 ΔN56	Фрагмент 57-160 человеческого B6, слитый с SUMO, несущим на N-конце гис-таг	человек	pETHSUL	ампициллин	23 (11,0)
HSPB6 (1-149) (pB6ΔC)	Фрагмент 1-149 человеческого B6, слитый с SUMO, несущим на N-конце гис-таг	человек	pETHSUL	ампициллин	28 (16,1)
HSPB6 (7-153)	Фрагмент 7-153 человеческого B6	человек	pET23	ампициллин	15,8
HSPB6 (7-153) C46S	Фрагмент 7-153 человеческого B6, замена единственного цистеина, блокирующая образование дисульфидного моста	человек	pET23	ампициллин	15,8
HSPB6 АКД (B6 АКД)	альфа-кристаллиновый домен, слитый с SUMO, несущим на N-конце гис-таг (72-149)	человек	pETHSUL	ампициллин	21 (8,6)
HSPB6 S16D	полноразмерный бестаговый, замена, имитирующая фосфорилирование (1-160)	человек	pET23	ампициллин	17,1
HSPB5 (B5)	полноразмерный бестаговый (1-175)	человек	pET23	ампициллин	20,1
Tau	Гис-таг на N-конце, отщепляемый 3С протеазой (1-352)	человек	pET28	канамицин	38,9 (36,8)
PKA	Гис-таг на N-конце, отщепляемый тромбином	мышь	pET15	ампициллин	44,9
PKA	Гис-таг на N-конце, отщепляемый тромбином	мышь	pACYC	хлорамфеникол	44,9
STARD1	MBP с гис-тагом на N-конце, отделяемый от партнера 3С протеазой (46-285)	человек	Н-MBP-3С	ампициллин	70 (27)
STARD1 S56A	MBP с гис-тагом на N-конце, отделяемый от партнера 3С протеазой (46-285)	человек	Н-MBP-3С	ампициллин	70 (27)
STARD1 S56G	MBP с гис-тагом на N-конце, отделяемый от партнера 3С протеазой (46-285)	человек	Н-MBP-3С	ампициллин	70 (27)
3С протеаза	MBP с гис-тагом на N-конце, нет 3С сайта	вирус HRV-14	Н-MBP-3С	ампициллин	66
TEV протеаза	Гис-таг на N-конце	вирус мозаики табака	pET28	канамицин	28

2.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1. Клонирование и сайт-направленный мутагенез

Все мутантные формы были получены в данной работе на основе кДНК исходных белков методом мегапраймера [354] с использованием высокоточной ДНК-полимеразы *Pfu* и праймеров, приведенных в Табл. 7. Для выделения фрагментов ДНК использовали набор GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific). В Табл. 9, Табл. 10 и Табл. 11 приведены все генетические конструкции, полученные или использованные в работе, где также указаны плазмиды, в которые они были клонированы. Для очистки плазмидных ДНК использовали набор GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific). Корректность и целостность всех молекулярно-биологических конструкций, используемых в работе, были подтверждены ДНК секвенированием в компании Евrogen (Россия).

Мутантные варианты 14-3-3ζ (Uniprot ID P63104; остатки 1-245 из 245) были получены на основе плазмиды pET21, кодирующей белок дикого типа. Три участка – E⁵, ¹²LAE¹⁴ и ⁸²YREKIE⁸⁷ – были подвергнуты мутации. Каждый из них был обозначен как W (дикий тип) или M (мутированный). Мутантная кДНК с заменами E5K, ¹²LAE¹⁴ → ¹²QQR¹⁴ и ⁸²YREKIE⁸⁷ → ⁸²QRENIQ⁸⁷ (так называемый MMM мутант [233]) была получена в два этапа мегапраймерным методом [354] с использованием T7 forward и Zeta-MMW reverse и Zeta-WWM reverse праймеров (здесь и далее в тексте приведены названия праймеров, последовательности которых сведены в Табл. 7). Вариант WMM с интактным остатком E5 был получен случайно. Мутанты WMW и MMW были получены путем замены мутантной области мутантов WMM и MMM, кодирующих последовательность ⁸²QRENIQ⁸⁷, на последовательность дикого типа с использованием ближайших сайтов рестрикции. Мутантные формы, содержащие замену S58E, имитирующую фосфорилирование, были получены с использованием мутагенного праймера Zeta-S58E reverse.

Для ко-экспрессии с РКА и белком-партнером кДНК белка 14-3-3σΔC (Uniprot ID P31947; остатки 1-231 из 248) была перенесена во второй сайт множественного клонирования (MCS2) вектора CDFduet-1 с использованием сайтов *NdeI/XhoI*. кДНК каталитической субъединицы РКА мыши была перенесена из вектора pET15 в сайт множественного клонирования (MCS1) вектора pACYCduet-1 с использованием сайтов *NcoI/BamHI*. кДНК зародышевой изоформы Тау человека, содержащая три повтора (3R-Тау) в тубулин-связывающем домене (Uniprot ID P10636-2; 352 остатка), была перемещена из плазмиды pET23 в модифицированный вектор pET28-His-3C, содержащий N-концевой гис-

таг МЕННННННЛЕVLFQ↓GPH, отщепляемый 3С протеазой (место расщепления показано стрелкой), с использованием *NdeI/XhoI* сайтов (Табл. 23). Плазмида, кодирующая Тау с отщепляемым гис-тагом, созданная в нашей работе, была депонирована в *Addgene* (www.addgene.org) под регистрационным номером 100092.

Для улучшения кристаллизации в белке 14-3-3σ были разработаны замены ¹⁵⁹ККЕ¹⁶¹ → ААА, обозначенные Clu1, и ⁷⁵ЕЕК⁷⁷ → ААА, обозначенные Clu3, в соответствии с подходом уменьшения поверхностной энтропии (SER) [355]. Мутанты получали путем сайт-направленного мутагенеза на основе 14-3-3σΔС с использованием мутагенных праймеров clu1-AAA-forward и clu3-AAA-reverse, а затем клонировали в модифицированный вектор рЕТ28-His-3С. После обработки 3С протеазой конечные продукты сохраняли неприродные остатки GPH на N-конце.

кДНК химеры 14-3-3σ с пептидом RRAS¹⁶APL белка HSPB6 (CH1) была получена за одну стадию ПЦР на основе конструкции рЕТ28-His-3С_14-3-3σΔС-Clu3 с использованием праймеров T7 forward и 1,5-кратного молярного избытка праймера CH1 reverse, кодирующего помимо сайта рестрикции *XhoI* пептид HSPB6 и линкер GSGS. Плазмида, кодирующая химеру CH1, созданная в нашей работе, была депонирована в *Addgene* (www.addgene.org) под регистрационным номером 100093.

кДНК химер CH2-CH5 белка 14-3-3σ с пептидами других белков-партнеров получали на основе конструкции CH1 той же процедурой, что и для CH1, но с использованием следующих обратных праймеров, кодирующих пептидные и линкерные последовательности и сайт *XhoI*: CH2 reverse (Gli1-3), CH3 reverse (AANAT), CH4 reverse (STARD1 Ser57), CH5 reverse (STARD1 S195) (Табл. 10). Полученные конструкции были вставлены в модифицированный вектор рЕТ28-His-3С с использованием сайтов *NdeI* и *XhoI*.

кДНК варианта 14-3-3ζΔС (Uniprot ID P63104; остатки 1-229 из 245) с модификациями последовательности S58A и ¹⁵⁷ККЕ¹⁵⁹ → ААА, соединенная с остатками 71-81 белка BAD человека с помощью линкера GSGG, была оптимизирована по кодонному составу для экспрессии в *E.coli* с помощью *COOL* [356] и синтезирована в Integrated DNA Technologies (Айова, США) (Рис. 21). Последовательность 14-3-3ζΔС была фланкирована сайтами рестрикции *NdeI* и *VamHI* для обеспечения удобного изменения пептидных последовательностей 14-3-3 или BAD в дальнейшем. Аффинные таги не были включены. К 5'- и 3'-концам этого фрагмента ДНК добавляли гомологичные участки размером 40 п.н. для сборки в векторе рЕТ28, обработанном рестриктазами *XbaI/XhoI*, по методу *SLiCE* [357]. Собранный вектор рЕТ28_1433ζΔС-BAD75 трансформировали в клетки DH10β, высевали на

чашки с LB/агаром, содержащие 50 мкг/мл канамицина, и выращивали в течение ночи при 37 °С. Отобранные колонии выращивали в жидкой культуре, из которой ДНК очищали и секвенировали для подтверждения точности (Genscript, США).

кДНК варианта 14-3-3ζΔС (Uniprot ID P63104; остатки 1-229 из 245) с модификациями последовательности S58A, ⁷³ЕКК⁷⁵ → ААА и ¹⁵⁷ККЕ¹⁵⁹ → ААА, соединенную с С-концевым гептапептидом белка 18Е6 с помощью линкера GGGG, оптимизировали по кодонному составу и синтезировали в Integrated DNA Technologies (Айова, США) (Рис. 20). Последовательность 14-3-3ζΔС была фланкирована сайтами рестрикции *NdeI* и *AgeI* для обеспечения удобного изменения последовательностей 14-3-3 или 18Е6 в дальнейшем. Вся конструкция была встроена в модифицированный вектор рЕТ28-His-3С с использованием сайтов рестрикции *NdeI* и *XhoI*.

Мутантную форму белка HSPB6 человека (Uniprot ID O14558, остатки 1-160) с заменой S16D, имитирующей фосфорилирование основного участка, получали с использованием праймера B6-S16D forward на основе последовательности белка дикого типа. Укороченную с N- и С-концов конструкцию HSPB6 (остатки 7-153) получали с помощью праймеров 7NT-B6 forward и 153CT-B6 reverse, а затем клонировали в вектор рЕТ23 с использованием сайтов рестрикции *NdeI* и *XhoI*.

Для получения белок-белковой химеры 14-3-3σ с B6 (14-3-3-B6) использовали конструкцию пептидной химеры CH1 и последовательность B6 (остатки 12-153 из 160), полученную в ПЦР с плазмиды рЕТ23-HSPB6 WT с использованием праймеров B6chim forward и 153CT-B6 reverse. ПЦР продукт, соответствующий B6 (остатки 12-153) и обработанный рестриктазами *BglII* и *XhoI*, был вставлен без сдвига рамки считывания после последовательности 14-3-3 в вектор рЕТ28-His-3С-CH1, обработанный эндонуклеазами рестрикции *BamHI* и *XhoI*.

кДНК белка STARD1 человека (Uniprot P49675) была амплифицирована с плазмиды рQE30-N62 [349] с помощью праймеров STAR66 forward и рQE30 reverse (Табл. 7) и лигирована в вектор Н-MBP-3С [347] с использованием сайтов *BamHI* и *HindIII*. Полученная конструкция, содержащая только липид-связывающий домен STARD1 (остатки 66-285) была продолжена в сторону N-конца белка, чтобы захватить сайт фосфорилирования в районе остатка Ser57, в двухэтапном ПЦР с использованием праймеров STAR53 forward и STAR46 forward. В качестве обратного праймера на каждом этапе использовался праймер НMBP3С-reverse. Для секвенирования был синтезирован праймер MBP forward (Табл. 7). Оптимизированная по кодонному составу последовательность STARD1 с мутациями S56G и

S56A, фланкированная сайтами *Bam*HI и *Hind*III для последующего клонирования в вектор Н-MBP-3С, была синтезирована в Integrated DNA Technologies (Айова, США). Плазмида, кодирующая белок STARD1 (остатки 66-285), присоединенный к С-концу MBP, была депонирована в *Addgene* (www.addgene.org) под регистрационным номером 100094.

2.2.2. Трансформация клеток плазмидной ДНК

Проверенные секвенированием плазмиды использовали для трансформации компетентных клеток *E.coli*, приготовленных с использованием двухвалентных ионов по методике [358]. Для амплификации плазмидной ДНК использовали клетки штаммов DH5 α или DH10 β . Для экспрессии белков использовали клетки BL21(DE3), C41(DE3) и Rosetta(DE3)pLysS.

Перед трансформацией суспензию клеток оттаивали во льду в течение 30 мин и вносили в нее 1-2 мкл плазмид (20-100 нг/мкл ДНК), оставляя на полчаса во льду. Для проведения теплового шока клетки затем помещали на 45 с в водный термостат при 42 °С и сразу после этого переставляли в лед на 3 мин. Затем к образцу добавляли 900 мкл холодной среды Луриа-Бертани (LB, Amresco). Подращивание трансформантов проводили в течение часа при 37 °С на шейкере при скорости вращения 1400 об/мин. После этого клетки собирали центрифугированием в течение 3 мин при 5000 об/мин на центрифуге Minispin Plus (Eppendorf). Супернатант удаляли, осадок пипетировали и в стерильных условиях распределяли шпателем по поверхности среды LB-агар, содержащей необходимые антибиотики для селекции. Чашки Петри оставляли при 37 °С в течение ночи, а затем одиночные колонии использовали для запуска жидкой культуры.

Для ко-экспрессии двух или более белков проводили ко-трансформацию соответствующими плазмидами, снижая концентрацию антибиотиков в среде LB-агар. Альтернативно, делали последовательные трансформации, каждый раз делая трансформанты компетентными к получению новой плазмиды [358]. Обе схемы трансформации приводили к одинаковым уровням экспрессии белка, но отличались по удобству и трудоемкости.

2.2.3. Экспрессия и ко-экспрессия белков в клетках *E.coli*

Для препаративной экспрессии белков вначале получали так называемую «ночную культуру», для чего одиночные колонии трансформантов помещали в 20 мл среды LB,

содержащей необходимые антибиотики, и оставляли при 37 °С на ночь. 20 мл «ночной культуры» добавляли к 1 л среды LB с необходимыми антибиотиками и оставляли в шейкере при интенсивном перемешивании до достижения оптической плотности при 600 нм равной 0,6-0,8. По достижении указанной оптической плотности вносили индуктор экспрессии, изопропил-β-тиогалактозид (ИПТГ), до конечной концентрации 0,1-1 мМ, продолжая инкубацию в течение 4-48 ч при температуре 16-37 °С, в зависимости от задачи. Для быстрой экспрессии белков с хорошей растворимостью экспрессию проводили в течение 4 ч при 37 °С, индуцировав 1 мМ ИПТГ. В случае ко-экспрессии с РКА или в случае экспрессии проблемных белков с ограниченной растворимостью экспрессия занимала до 48 ч при 16 °С и низкой концентрации индуктора (0,1 мМ). Химерные конструкции на основе 14-3-3 экспрессировали в течение 20 ч при 25-30 °С и концентрации ИПТГ, равной 0,5 мМ. В этом случае, а также при получении белков, фосфорилируемых под действием РКА, проводили экспрессию в отсутствие или в присутствии РКА.

Белок В6 и его варианты давали более эффективную экспрессию при использовании модифицированной системы автоиндукции [359]: с применением 3-кратной среды LB без ИПТГ в течение 8 ч при 37 °С с последующей 12-16-часовой инкубацией при 20-30 °С.

Клетки зрелой бактериальной культуры собирали центрифугированием (1 ч, 3250 g). Полученный осадок ресуспендировали в 30-40 мл охлажденного буфера L (30 мМ Трис-НСl, рН 8,0, содержащего 100 мМ NaCl, 10 мМ имидазол, 0,05 мМ фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ)). Альтернативно, если белок очищался без использования металлоаффинной хроматографии, использовали лизис-буфер L, не содержащий имидазол, но содержащий 0,1 мМ ЭДТА и 15 мМ МЭ. В случае белков, особо чувствительных к протеолитической деградации (таких как Тау), в лизис-буфер дополнительно добавляли 0,001 мМ лейпептина и 0,001 мМ пепстатина. Полученные суспензии клеток в лизис-буфере замораживали и хранили при -80 °С, либо сразу использовали для очистки белка.

Растворимость белков анализировали с помощью гель-электрофореза по методу Лэммли [360] (см. ниже).

2.2.4. Выделение и очистка рекомбинантных белков

Суспензии клеток обрабатывали ультразвуком на льду, центрифугировали при 4 °С в течение 1 ч при 14000 g и фильтровали через складчатые фильтры для осветления супернатанта. В случае невысокого уровня экспрессии белка, проводили несколько раундов

экстракции, ресуспендируя полученный при центрифугировании лизата осадок и повторно подвергая его ультразвуковой обработке на льду, с последующим центрифугированием.

Для всех белков, содержащих гис-таг, осветленный лизат подвергали двухступенчатой «вычитающей» металлоаффинной хроматографии (IMAC1 и IMAC2) с последующей гель-фильтрацией. В случае Тау, который является нативно-развернутым термостабильным белком, мы дополнительно использовали термическую обработку (95 °С; 25 мин) с последующей вычитающей IMAC.

На первом этапе (IMAC1) супернатант наносили на 5 мл колонку HisTrap (GE Healthcare), уравновешенную буфером А (20 mM Трис, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM имидазол), собирая фракцию проскока. После этого колонку промывали этим же буфером, собирая фракцию промывки. При необходимости стадию промывки повторяли при более высокой концентрации имидазола (20-50 mM). Связанные белки элюировали буфером Б, который, по сравнению с буфером А, дополнительно содержал 500 mM имидазола. Для лучшего разделения пиков при элюции использовали 10-500 mM градиент имидазола.

Если гис-таг не требовал удаления (или не содержал сайты для протеолиза специфичными протеазами), элюат при IMAC1 концентрировали и подвергали гель-фильтрации. Так были получены, например, препараты специфических SUMO-протеазы, 3С протеазы и TEV протеазы, а также препарат РКА.

В остальных случаях элюат смешивали с 1000/1-100/1 количеством соответствующей специфической протеазы (оценивали по соотношению оптической плотности при 280 нм растворов белка и протеазы, соответственно) и диализовали против буфера А, содержащего дополнительно 2 mM ДТТ. Освобожденный от имидазола диализат центрифугировали или фильтровали и наносили повторно на колонку HisTrap, уравновешенную буфером А (IMAC2). На этой стадии с колонкой связывались только содержащие гис-таг протеаза и РКА (в случае ко-экспрессии), высвобожденный от целевого белка гис-таг и примесные белки, имеющие сродство к носителю, а высокоочищенный целевой белок попадал во фракцию проскока с низкой концентрацией имидазола. Перед нанесением на гель-фильтрационную колонку проскок при IMAC2 концентрировали с помощью устройств Amicon (Millipore) с необходимым отсечением по массе, а затем фильтровали через 0,22 мкм фильтры Millipore.

Белковый состав в разных фракциях анализировали с помощью ДСН-электрофореза [360].

Белки, не содержащие гис-таг, очищали с помощью комбинации фракционирования сульфатом аммония и колоночной хроматографии. На первом этапе к осветленному лизату при постоянном перемешивании небольшими порциями вносили сухой сульфат аммония до достижения необходимой степени насыщения, и оставляли во льду до формирования осадка, который затем отделяли от растворимой фракции центрифугированием. Белки В6 (его псевдофосфорилированная (S16D) форма и укороченная форма В6(7-153)) и В5 преципитировали в диапазоне 0-25% степени насыщения, белки 14-3-3 – в диапазоне от 35% и выше. Осадки, содержащие по данным ДСН-электрофореза наибольшее количество целевого белка, ресуспендировали в низкосолевым буфере Д (20 мМ Трис-НСl, рН 8,0, содержащий 10 мМ NaCl, 0,05 мМ ФМСФ и 15 мМ МЭ) и тщательно диализовали против нескольких смен этого буфера. Диализат фильтровали или центрифугировали и подвергали колоночной хроматографии.

Ионообменную хроматографию диализата проводили на колонке HiTrap Q HP (5 мл) (GE Healthcare), предварительно уравновешенной буфером Д, с использованием 0-1 М градиента NaCl на буфере Д.

Белки В5 и В6 затем подвергали гидрофобной хроматографии на 5 мл колонке HiTrap Phenyl HP (GE Healthcare), уравновешенной 0,3 М сульфатом аммония на буфере Д, внося в образец нанесения сульфат аммония до той же концентрации, а затем проводя его фильтрование. Элюцию белков проводили 0,3-0 М градиентом сульфата аммония на буфере Д. Белковый состав в разных фракциях анализировали с помощью ДСН-электрофореза. При очистке белков 14-3-3 гидрофобную хроматографию использовали только в случае мономерной мутантной формы 14-3-3 ζ m (WMW), при этом градиент сульфата аммония был более крутым (1-0 М). Димерные формы 14-3-3 в этих условиях на колонке не сорбировались из-за более низкой гидрофобности.

Фракции, наиболее обогащенные целевыми белками, концентрировали и подвергали гель-фильтрации на препаративных колонках фирмы GE Healthcare, в зависимости от массы целевого белка: Superdex 75 26/60 (14-3-3, пептидные химеры 14-3-3, В6, РКА, 3С протеаза, SUMO-гидролаза, TEV-протеаза) или Superdex 200 26/60 (MBP-STARD1, В5, S1, химера 14-3-3-В6). Объем образца нанесения не превышал 5 мл. Колонка предварительно была уравновешена буфером ГФ (20 мМ Трис-НСl, рН 7,6, содержащий 150 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и 15 мМ МЭ). В том случае, когда требовалось получить цистеин-содержащий белок в окисленной форме, восстановители в колоночный буфер не добавляли.

За профилями элюции следили, регистрируя а) поглощение при 280 нм с помощью детектора Varian 335 и б) флуоресценцию триптофана (возбуждение 298 нм, излучение 360 нм, низкое напряжение) с помощью детектора Varian 363, для того чтобы отличить пики белков и нуклеиновых кислот.

Очищенные белки диализовали против буфера Д (20 мМ Трис-НСl, рН 7,6, 150 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ФМСФ и 15 мМ МЕ), концентрировали на концентраторах Amicon (Millipore) с необходимым отсечением по массе и хранили замороженными при -80 °С. Чтобы избежать агрегации белка 14-3-3ζm, вызванной замораживанием-оттаиванием, его конечные препараты хранили в холодильнике в присутствии 0,02 % NaN₃. В этих условиях 14-3-3ζm оставался мономерным без каких-либо следов агрегации в течение по меньшей мере двух недель.

2.2.5. Фосфорилирование и дефосфорилирование белков *in vitro*

Фосфорилирование белков-партнеров 14-3-3 под действием РКА проводили *in vitro* для получения фосфорилированных препаратов как альтернативы препаратам, полученным при ко-экспрессии с РКА, а также для проверки полноты фосфорилирования образцов, ко-экспрессированных с РКА. В некоторых случаях фосфорилирование проводилось в присутствии следовых количеств радиоактивно-меченного [γ -³²P]АТФ для последующего исследования методами гель-электрофореза и автордиографии (см. ниже). Также в контрольных опытах проводили фосфорилирование белков 14-3-3 с целью выявления возможных последствий ко-экспрессии с РКА для различных изоформ и идентификации участков фосфорилирования в димерной и мономерной формах 14-3-3ζ.

Белок В6 (60 мкМ в пересчете на мономер) фосфорилировали с помощью 0,01-0,04 мг/мл рекомбинантной РКА в буфере Ф1 (50 мМ Трис-НСl, рН 7,4, содержащий 150 мкМ АТФ, 4 мМ MgCl₂, 10 мМ NaCl и 2 мМ ДТТ) в течение 1 ч при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 10 мМ ЭДТА или быстрой сменой буфера с удалением ионов Mg²⁺ и АТФ и хранили аликвоты при -80 °С. В таких условиях стехиометрия фосфорилирования В6 была близка к 1 моль фосфата на 1 моль белка [132, 217].

Для использования автордиографии Тау белок (10-12 мкМ) инкубировали в буфере Ф2, содержащем 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 10 мМ глицерол-1-фосфат, 1 мМ MgCl₂, 0,1 мМ ФМСФ, 15 мМ МЭ, 150-250 мкМ АТФ и следовые количества [γ -³²P]АТФ в присутствии РКА в течение 4 ч при 37 °С. Благодаря термостабильности Тау, после нагревания

инкубационной смеси до 90 °С в течение 5 мин проводили центрифугирование для удаления денатурированных белков. В отличие от многих других белков, фосфорилирование Тау сопровождается изменением электрофоретической подвижности не только в нативных условиях, но и при гель-электрофорезе в присутствии ДСН.

Белки 14-3-3ζ WT, 14-3-3ζm и 14-3-3ζmS58E (1 мг/мл) фосфорилировали под действием РКА в 50 мМ буфере HEPES-NaOH, pH 7,3, содержащем 10 мМ NaCl, 4 мМ MgCl₂, 15 мМ МЭ, 0,1 мМ ФМСФ и 0,2-0,3 мМ АТФ. Реакционную смесь инкубировали при 37 °С и останавливали в разное время добавлением холодного раствора ЭДТА до конечной концентрации 10 мМ.

Для того чтобы выявить любые нежелательные последствия фосфорилирования, различные изоформы 14-3-3 (14 мкМ в пересчете на мономер) инкубировали с большими количествами РКА (2 мкМ) в буфере Ф3 (50 мМ HEPES-NaOH, pH 7,3, содержащем 10 мМ NaCl, 4 мМ MgCl₂, 60 мкМ АТФ) в течение 2 ч при 30 °С, а затем следили за возможным появлением мономерных фосфорилированных форм с помощью нативного электрофореза.

Дефосфорилирование белков проводили с помощью термочувствительной щелочной фосфатазы FastAP (Thermo Fisher Scientific) в 10 мМ буфере Трис-HCl, pH 8,0, 5 мМ MgCl₂, 100 мМ KCl в течение 1,5 ч при 37 °С. По необходимости буфер дефосфорилирования мог содержать 0,1 мг/мл БСА для стабилизации белка-субстрата, согласно рекомендации производителя.

Результаты фосфорилирования и дефосфорилирования оценивали по изменениям электрофоретической подвижности белков при нативном гель-электрофорезе при pH 8,6 (см. ниже). В случае Тау также использовали ДСН-электрофорез. Гели окрашивали Кумасси R250. В некоторых случаях кинетику фосфорилирования анализировали с помощью денситометрии в программе *ImageJ*. В отдельных случаях результаты фосфорилирования также анализировали с помощью масс-спектрометрии по методу MALDI.

Автор благодарен вед.специалисту М.В. Серебряковой, м.н.с. И.А. Каменихиной, м.н.с. Л.А. Новиковой и м.н.с. Т.Ю. Исайкиной за помощь в проведении масс-спектрометрического анализа.

2.2.6. Спектроскопия кругового дихроизма

Метод кругового дихроизма (КД) широко применяется для анализа вторичной структуры белка и основан на асимметричности его α-спиралей и β-складок. Ввиду такой

асимметрии элементы вторичной структуры обладают оптической активностью, т.е. по-разному поглощают лево (L-) и право (R-) поляризованный свет. При данной длине волны (λ , нм) каждый тип вторичных структур характеризуется своими величинами коэффициентов экстинкции для света, поляризованного вправо (ϵ_R) или влево (ϵ_L). Для характеристики дихроичности чаще всего используют параметр молярной эллиптичности, выражаемый через дихроичное поглощение ($\Delta\epsilon_\lambda$) как $[\Theta_\lambda]=3300*\Delta\epsilon_\lambda$ [361]. Для белков часто используют среднюю эллиптичность на аминокислотный остаток [362], которая равна $[\Theta_\lambda]=([\Theta_\lambda]*M)/10*C*L$, где $[\Theta_\lambda]$ – измеряемая на дихрографе эллиптичность в градусах, M – средняя молекулярная масса аминокислотного остатка, C – концентрация белка в мг/мл, а L – длина оптического пути в см.

Зависимость $\Theta(\lambda)$ является спектром КД. α -Спирали, β -складки, а также неупорядоченные структуры вносят разный вклад в спектр КД исследуемого белка, поэтому его состав фактически определяет амплитуду и форму спектра КД в дальнем УФ (190-260 нм). Спектры КД α -спиральных белков имеют два минимума при 208 и 222 нм и один максимум в районе 192 нм. Спектры КД β -складчатых белков обладают одним минимумом при 208-217 нм и одним максимумом при ~195 нм. Спектр модельного 100% беспорядочного клубка имеет один минимум около 192 нм и один максимум в районе 215 нм [363].

Оценку доли вторичных структур осуществляли с помощью методов Гринфельд-Фасмана (1969) [364] и Срирама-Вуди (2000) [365], используя веб-сервер *DichroWeb* (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>).

Перед измерениями препараты белка 14-3-3 ζ и его мутантных форм 14-3-3 ζ m и 14-3-3 ζ mS58E (0,08-1,5 мг/мл) диализовали против 15 мМ буфера Tris-HCl, pH 8,0, 1 мМ МЭ в течение ночи, а затем фильтровали через 0,22 мкм фильтры Millipore и измеряли концентрацию белка при 280 нм. Спектры КД регистрировали при 5 или 25 °С. Перед регистрацией образцы оставляли уравниваться при соответствующей температуре в течение 5 мин. Все спектры регистрировали в диапазоне 184-260 нм со скоростью 1 нм/мин в 0,02 см кварцевой кювете на дихрографе Chirascan (Applied Photophysics), снабженном термоприставкой, а затем вычитали сигнал буфера, прописывая его спектр в идентичных условиях. Для расчета молярной эллиптичности на остаток (град * см² * дмоль⁻¹) мы использовали средние веса остатков 14-3-3, равные 113,2 (для WT), 113,4 (для S58E) и 113,8 г * моль⁻¹ (для ζ mS58E).

В другой серии экспериментов спектры КД белков B6 или pB6 (0,4 мг/мл) и 14-3-3 ζ m (0,6 мг/мл) регистрировали в 8 мМ буфере HEPES-NaOH (pH 7,3), содержащем 25 мМ NaCl,

0,25 мМ MgCl₂, 0,2 мМ ДТТ. Спектры регистрировали в диапазоне 190-260 нм со скоростью 0,5 нм/мин в 0,02 см кварцевой кювете на Chirascan (Applied Photophysics) при 20 °С.

Автор признателен к.б.н. В.В.Шубину за помощь в проведении этих экспериментов.

2.2.7. Флуоресцентная спектроскопия

2.2.7.1. Измерение собственной флуоресценции белков

Определяющий вклад во флуоресценцию белка дают его остатки триптофана. В зависимости от их локализации в белковой глобуле и молекулярного окружения, спектр флуоресценции может иметь разную форму и положение максимума. Спектр флуоресценции остатка триптофана, расположенного в гидрофобном молекулярном окружении и удаленного от поверхности глобулы, имеет более коротковолновый максимум по сравнению со спектром триптофана, расположенного в гидрофильном окружении и экспонированного в растворитель [366].

Спектры флуоресценции белков, содержащих остатки триптофана, в концентрации (0,02-0,1 мг/мл) в 20 мМ буфере HEPES-NaOH, pH 7,3, содержащем 100 мМ NaCl, 4 мМ MgCl₂, 15 мМ МЭ, регистрировали в диапазоне 300-450 нм на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian Inc.) при длине волны возбуждения 295 нм и ширине щелей монохроматоров 5 нм при температуре 25 °С. Температура поддерживалась с помощью встроенной приставки Пельтье. Перед измерением флуоресценции образцы были отфильтрованы через 0,22 мкм фильтры Millipore.

2.2.7.2. Исследование гидрофобности белков при связывании флуоресцентного зонда бис-АНС

Для исследования гидрофобных свойств белков широко применяется сольватохромный флуоресцентный зонд анилинафталинсульфонат (АНС) или его димер бис-АНС. При взаимодействии зонда с гидрофобными поверхностями белков происходит смещение максимума и сильное увеличение квантового выхода его флуоресценции. Соединение бис-АНС в свободной форме в водных растворах имеет максимум флуоресценции около 525 нм и чрезвычайно низкий квантовый выход. При изменении окружения на неполярное многократно возрастает квантовый выход флуоресценции бис-АНС, а максимум флуоресценции смещается к 495 нм [367]. Измеряя интенсивность

флуоресценции при 495 нм при титровании белка раствором бис-АНС, можно получить полезные сведения о гидрофобных свойствах исследуемого белка.

Для того чтобы сравнить гидрофобные свойства белка В6 и его мутантой формы S16D, мы титровали оба белка с помощью флуоресцентного зонда бис-АНС. Эксперименты были выполнены на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian) в термостатированной ячейке (37 °С) в 20 мМ буфере HEPES-NaOH, pH 7,3, содержащем 150 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и 15 мМ МЭ. Образцы белка (1,6 мкМ), отфильтрованные через 0,22 мкм фильтры Millipore, титровали исходным раствором бис-АНС, так что общая концентрация зонда находилась в диапазоне 0-13 мкМ. Флуоресценцию возбуждали при 297 нм и регистрировали в диапазоне 305-590 нм для отслеживания спектральных изменений при переносе энергии с остатков триптофана на бис-АНС или возбуждали при 385 нм и регистрировали при 495 нм (время усреднения 10 с) для построения кривых титрования. Ширина щелей была равна 5 нм, а напряжение детектора до 700 В.

Аналогично гидрофобные свойства 14-3-3 и его мутантов анализировали, титруя раствор белка (1-3,6 мкМ) раствором бис-АНС (конечные концентрации 0-12 мкМ). После добавления каждой порции бис-АНС регистрировали спектры флуоресценции в диапазоне 310-575 нм (возбуждение 295 нм) и интенсивность флуоресценции бис-АНС при 495 нм, возбужденной при 385 нм (ширина щелей 5 нм). Все измерения проводились при 25 °С на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian Inc.).

Изменения гидрофобности 14-3-3 с ростом температуры анализировали, регистрируя интенсивность флуоресценции бис-АНС (возбуждение при 385 нм; излучение при 495 нм; щели – 5 нм) при нагревании образцов от 15 до 75 °С с постоянной скоростью 1 °С/мин. Перед экспериментом все образцы уравнивали в течение 7 мин при 15 °С.

2.2.7.3. Взаимодействие белков 14-3-3 с AEDANS-меченным HSPB6

Полноразмерный белок В6, стехиометрически фосфорилированный по остатку Ser16, был диализован против 20 мМ HEPES буфера (pH 7,5), содержащего 100 мМ NaCl. Для восстановления SH группы единственного остатка Cys46 к белку добавляли 20 мМ ДТТ и инкубировали 20 мин при комнатной температуре, а затем избыток ДТТ удаляли с помощью обессоливающих колонок NAP-5 (Illustra, GE Healthcare). Сразу после этого добавляли 6-кратный молярный избыток свежего водного раствора 5-[2-(йодоацетамидо)этиламино]нафталин-1-сульфоновой кислоты (1,5-I-AEDANS) и

инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем ночь при 4 °С. После удаления несвязанной метки с использованием концентратора Amicon (Millipore) и колонки NAP-5, степень мечения оценивали спектрофотометрически при 336 нм с использованием коэффициента экстинкции AEDANS, равного $5700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (>90%). Флуоресценцию AEDANS отслеживали с использованием спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian Inc.), снабженного термоприставкой. Титрование фосфорилированного HSPB6, меченного AEDANS, проводили в кварцевых кюветах (600 мкл) при 30 °С, добавляя 14-3-3σΔС порциями по 1-2 мкл, перемешивая пипетированием и оставляя для полного уравнивания на 5 мин.

Для оценки кажущихся констант диссоциации комплексов, кривые титрования белка в буфере корректировали на титрование буфера и затем фитировали в Origin 9.0 с помощью классического квадратного уравнения [368] (прямое титрование в отсутствие фосфопептида), или с помощью кубического уравнения [369] при конкурентном титровании.

Автор благодарен К.В. Тугаевой за помощь в проведении этих экспериментов.

2.2.7.4. Исследование взаимодействия белков с пептидами с помощью метода поляризации флуоресценции

При связывании флуоресцирующих лигандов, имеющих ввиду малого размера высокую скорость вращения и деполяризации флуоресценции, с белком происходит замедление вращения лиганда и деполяризации его флуоресценции. Это удобно использовать в экспериментах по лиганд-белковым взаимодействиям на приборах, снабженных поляризующими фильтрами для возбуждающего и испускаемого света.

Пептид pB6 (остатки 11-23), выполняющий роль репортера, метили флуоресцеин изотиоцианатом (FITC, Sigma-Aldrich) в буфере HEPES (pH 8,2) и реакцию останавливали с помощью 100 мМ Трис. Меченый пептид затем отделяли от избытка метки на колонках NAP-5. Поляризацию флуоресценции измеряли с помощью устройства для считывания микропланшетов PHERAstar (BMG Labtech, Германия) с использованием фильтров 485 ± 20 нм и 528 ± 20 нм (для возбуждения и испускания, соответственно). При прямых измерениях поляризации флуоресценции готовили серию разбавлений белка 14-3-3 в 96-луночных планшетах в 20 мМ HEPES буфере, pH 7,5, который содержал 150 мМ NaCl, 0,5 мМ TCEP, 0,01% Tween 20 и 50 нМ флуоресцентно-меченного пептида. Объем серии разведений составлял 40 мкл, который впоследствии был разделен на три технических повторности по

10 мкл каждая при переносе в 384-луночные микропланшеты с низким связыванием (E18063G5, Greiner Bio-One, Австрия). Всего поляризацию флуоресценции репортерного фосфопептида измеряли при 8 различных концентрациях белка (в контроле один из них не содержал белка и соответствовал свободному фосфопептиду). При измерении аффинности выбранных фосфопептидов к 14-3-3, в режиме конкуренции с репортерным флуоресцентным пептидом, готовили смесь последнего с 14-3-3, дающую 60-80% комплекса по данным прямого титрования. Затем эту смесь использовали для создания серии разведений конкурента (то есть исследуемых фосфопептидов), и проводили измерение так же, как в прямом эксперименте. Анализ экспериментов с поляризацией флуоресценции проводился в программе *ProFit*, написанной на *Python* [370] и доступной онлайн (<https://github.com/GoglG/ProFit>). Константу диссоциации в прямом и конкурентном эксперименте получали путем фитирования измеренных данных квадратичным и кубическим уравнением, соответственно [369, 371]. Автор признателен д-ру Г.Гогль за помощь в проведении этих экспериментов.

2.2.8. Изотермическая титрационная калориметрия

Изотермическая титрационная калориметрия (ИТК) является методом «золотого стандарта» для исследования взаимодействий различных молекул, включая белок-белковые и белок-лигандные, на основе изменения теплового эффекта, без необходимости мечения или иммобилизации [372, 373].

Связывание фосфопептида pB6 (остатки 11-23) с белками 14-3-3 γ , 14-3-3 ζ или 14-3-3 σ анализировали с использованием системы MicroCal iTC200 (GE Healthcare) при 30 °C в 20 mM Трис-HCl буфере (pH 7,6), содержащем 150 mM NaCl, 0,1 mM ЭДТА и 2 mM МЭ. Аликвоты по 2 мкл белка 14-3-3 вводили в 200 мкл ячейку, содержащую фосфопептид, до получения полной изотермы связывания. Концентрация фосфопептида pB6(11-23) в ячейке составляла 44 мкМ (титрование 0,5 mM 14-3-3 γ), 40 мкМ (титрование 0,6 mM 14-3-3 ζ) или 100 мкМ (титрование 1 mM 14-3-3 σ). Измерения были проведены по меньшей мере три раза с разными концентрациями белка и пептида. Полученные данные были скорректированы на теплоту разбавления, измеренную путем введения 14-3-3 в буферный раствор. Кривые титрования были построены и фитированы с использованием программного обеспечения MicroCal Origin 9.0. Автор признателен к.б.н. А.А. Куликовой за помощь в проведении этих экспериментов.

2.2.9. Аналитическая гель-фильтрация с многопараметрической детекцией

Метод гель-фильтрации использовали для исследования олигомерного состояния белков, белок-белковых взаимодействий, а также как способ разделения частиц перед многопараметрической детекцией методами MALLS и МУРР. В зависимости от задачи, использовали колонки Superdex 200 HR 10/300 (Amersham Pharmacia), Superdex 200 10/300 Increase, Superdex 200 5/150 Increase (GE Healthcare), BioSep-SEC-S3000 (Phenomenex) или ProSEC300S (Varian), которые были подключены к хроматографической системе Prostar 335/363 (Varian), оснащенной диодно-матричным детектором поглощения в полном спектре от 190 до 900 нм (шаг 1 нм и ширина щели 4 нм) и детектором флуоресценции с настраиваемой длиной волны (200-950 нм) и чувствительностью детектора. 3D-профили и спектры были извлечены из данных с диодной матрицы с использованием собственного скрипта на основе *Python* и обработаны в программе OriginPro 8.0 (OriginLab, США). При необходимости фракции собирали и анализировали методом ДСН-электрофореза.

Для лучшего разделения типичные объемы нанесения не превышали 1/50 объема колонки. Типичный диапазон наносимых концентраций варьировал от 0,05 до 10 мг/мл. Наиболее типичный буфер ГФ содержал 20 мМ Трис-НСl, рН 7,6, 150 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА. Дополнительные добавки указаны отдельно. Эксперименты по исследованию влияния фосфата и его аналогов подразумевали уравнивание колонки буфером с соответствующей концентрацией фосфата или анионов-аналогов (сульфат, пирофосфат, глицерол-1-фосфат и глицерол-2-фосфат) с доведением рН и сохранением ионной силы на одинаковом постоянном уровне, соответствующем таковому в буфере ГФ, что достигалось добавлением необходимых компенсирующих количеств NaCl. Для создания восстанавливающих условий в буфер был добавлен 15 мМ МЭ или 5 мМ ДТТ (если не сказано другое). В том случае, когда проводили разделение частиц на ГФ колонке непосредственно перед их детекцией с помощью МУРР на синхротроне, в колоночный буфер добавляли 5 мМ ДТТ и 3% глицерол для уменьшения возможного радиационного повреждения образцов. Во всех случаях, перед уравниванием колонки и проведением экспериментов колоночный буфер фильтровали через 0,1 мкм фильтры Millipore.

Для определения гидродинамического радиуса (радиуса Стокса) и массы частиц, элюирующихся в выбранном пике на профиле элюции, использовали калибровку колонки с помощью белков с известными массами и радиусами. Для определения радиуса сначала определяли коэффициент доступности (K_{av}), равный $(V-V_0)/(V_T-V_0)$, где V – объем элюции для

исследуемого пика, V_0 – свободный объем колонки, V_t – полный объем колонки. После определения коэффициента доступности для исследуемого белка и белков-маркеров строили калибровочную зависимость $(-\log(K_{av}))^{0.5}$ от R_s (где R_s радиус Стокса белков-стандартов) и по ней определяли радиус Стокса исследуемого белка [374]. Кажущуюся массу исследуемого белка определяли с помощью калибровочной зависимости $\log M$ от V , построенной на основе объемов элюции белков-стандартов. В качестве белков-стандартов для калибровки колонки использовали тиреоглобулин (670 кДа, 77,6 Å), апоферритин (440 кДа, 62 Å), каталазу (232 кДа, 52 Å), ГАФД (144 кДа, 42 Å), БСА (68 кДа, 35 Å), овальбумин (43 кДа, 27 Å), химотрипсиноген (25 кДа, 22,5 Å) и α -лактальбумин (15 кДа, 19 Å).

Абсолютные массы частиц анализировали, используя многопараметрическую детекцию. Многоугловое рассеяние лазерного света (MALLS) при трех разных углах измеряли с помощью модуля miniDawn TREOS II (Wyatt Technology, США), соединенного с рефрактометром OptiLab T-Rex (Wyatt Technology, США) для определения концентрации белка независимо от наличия хромофоров. При расчетах массы значение инкремента показателя преломления dn/dc было взято равным 0,185, и использовался формализм Цимма [375]. Детектор MALLS был откалиброван относительно рассеяния толуола и, в сочетании с рефрактометрическим сигналом, использовался для определения распределения молекулярной массы частиц, элюирующихся с ГФ колонки. Данные с детекторов обрабатывались в программе *Astra 5.3.4* (Wyatt Technology, США) для получения окончательных профилей и распределений.

2.2.10. Седиментационный анализ

Седиментационный анализ (ультрацентрифугирование) широко используется для определения размера и олигомерного состояния белков, а также для изучения их взаимодействий. Основной параметр, определяемый при обработке данных по ультрацентрифугированию, коэффициент седиментации (s , 10^{-13} c^{-1}), зависит от размера исследуемых макромолекул (от их молекулярной массы) как $\sim M^{2/3}$, а радиус Стокса (R_s) – величина, которая обуславливает поведение частиц при гель-фильтрации, зависит от размера частиц как $\sim M^{1/3}$. Ввиду этого метод ультрацентрифугирования лучше, чем метод гель-фильтрации, позволяет различать гидродинамические свойства макромолекул, в том числе белков и их комплексов, имеющих сходные размеры [376, 377]. Однако метод ультрацентрифугирования и гель-фильтрации часто рассматриваются как комплементарные.

Перед проведением седиментационных экспериментов образцы белков диализовали против буфера, в котором проводился эксперимент, в течение ночи. Типичный буфер имел состав 20 мМ Трис-НСl, рН 7,6, 150 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 0,5 мМ ДГТ, однако мог содержать добавки, указанные специально. После диализа концентрации белков выравнивали по величине оптической плотности при 280 нм. Ультрацентрифугирование проводили на аналитической центрифуге Beckman (модель E), снабженной оптической системой детекции, помещая образцы объемом 400 мкл в двухсекторные кюветы 6-ячеечного ротора AnJ-Ti. Кривые седиментации регистрировали при 230-290 нм (в зависимости от концентрации белка) с интервалом в 2,5-3 мин во всех кюветах одновременно. При обработке данных, как правило, первые 10-20 кривых, содержащих артефакты, отбрасывали.

Программа *SEDFIT* (<http://www.analyticalultracentrifugation.com/default.htm>) использовалась для оценки средневзвешенных коэффициентов седиментации из дифференциального распределения коэффициентов седиментации [c(s) от s] [378, 379], а специальное расширение «Fujita» для *SEDFIT* [380] использовалось для оценки распределения c(M) для отдельных белков. Подгонку считали оптимальной при минимальных значениях r.m.s.d. и остатков (residuals) и при отсутствии на диаграмме bitmap диагональных линий, означающих появление систематических различий между экспериментальными данными и подгонкой. Коэффициенты седиментации были скорректированы до стандартных условий (растворитель с плотностью и вязкостью воды при 20 °C) с использованием программ *SEDFIT* и *SEDNTERP* [381]. Парциальный объем белка принимали равным 0,73 мл/г, плотность и вязкость раствора рассчитывались в программе *SEDNTERP* (<http://www.jphilo.mailway.com/download.htm#SEDNTERP>). Автор глубоко признателен д.б.н. Н.А.Чеботаревой за помощь в проведении этих экспериментов.

2.2.11. Ограниченный протеолиз

Ограниченный протеолиз успешно используется для исследования доменной структуры белков, для изучения расположения специфических участков расщепления и их доступности к действию выбранной протеазы, а также позволяет судить о компактности белковой конформации и о конформационных изменениях белка в ответ на вводимые мутации или модификации [382].

В данной работе были использованы две протеазы, обладающие разной субстратной специфичностью, трипсин и химотрипсин. Для того чтобы элиминировать наличие

активности одной протеазы в препарате другой, были использованы ТРСК (ингибитор химотрипсина) и TLCK (ингибитор трипсина).

Ограниченный протеолиз 14-3-3 ζ и его мутантов (0,5 мг/мл) проводили в 30 мМ Трис-ацетатном буфере, рН 7,5, содержащем 10 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА и 15 мМ МЭ при 37 °С в течение 0-1,5 ч при весовом соотношении 14-3-3/ТРСК-трипсин или 14-3-3/TLCK-химотрипсин, равном 150/1 или 1000/1, соответственно. Реакцию останавливали добавлением 2 мМ ФМСФ, и белковый состав полученных таким образом образцов анализировали с помощью ДСН-электрофореза в 15% ПААГ [360].

Чтобы проанализировать влияние фосфата на химотрипсинолиз 14-3-3, мы использовали два буфера с одинаковой ионной силой, но разным составом, а именно: 20 мМ Трис-HCl (рН 7,5), содержащий 115 мМ NaCl и 2 мМ ДТТ или 50 мМ Na-фосфатный буфер (рН 7,5), содержащий 2 мМ ДТТ. Белковый состав образцов анализировали с помощью ДСН-электрофореза в 15% ПААГ [360].

Для того чтобы проанализировать эффект 14-3-3 на расщепление pB6, очищенный pB6 (1 мг/мл), его смесь с 1,2-кратным молярным избытком 14-3-3 γ или такое же количество свободного 14-3-3 γ в контроле предварительно инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. После этого добавляли ТРСК-трипсин в соотношении протеаза:pB6, равном 1:1500. Расщепление проводили при 37 °С в 20 мМ Трис-HCl, рН 7,6, содержащем 150 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и 15 мМ МЭ. Через различные промежутки времени реакцию останавливали добавлением Лэммли буфера для образцов, содержащего 2,5 мМ ФМСФ для остановки реакции. Образцы кипятили и анализировали с помощью ДСН-электрофореза в 12-20% градиентном ПААГ, а также обессоливали и анализировали с помощью масс-спектрометрии. Количественный денситометрический анализ полос проводили с использованием *ImageJ 1.48* (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>). Полосы, соответствующие протеолизу по остаткам R27 и R32, хотя и были различимы на гелях, были денситометрированы вместе.

Для изучения доменной структуры протеолиз фосфорилированной химеры 14-3-3-pB6 (1 мг/мл) проводили при 37 °С в 20 мМ Трис-HCl, рН 7,6, содержащем 150 мМ NaCl и 15 мМ МЭ, с использованием ТРСК-трипсина (массовое соотношение протеаза:субстрат – 1:12000) или TLCK-химотрипсина (массовое соотношение протеаза:субстрат – 1:6000), инкубируя образцы в течение различных периодов времени. Реакцию блокировали добавлением Лэммли буфера, содержащего ФМСФ. Затем образцы кипятили и анализировали с помощью ДСН-электрофореза. Значения кажущейся массы определяли с использованием *GelAnalyzer*

2010a (<http://www.gelalyzer.com/index.html>), сравнивая со значениями для фрагментов белков, рассчитанных с помощью *massXpert* [383].

2.2.12. Исследование термостабильности белков

2.2.12.1. Зависимость триптофановой флуоресценции от температуры

Поскольку флуоресценция остатка триптофана сильно зависит от его положения в белковой глобуле и от его ближайшего окружения, а, значит, априори отличается в нативном и денатурированном состоянии, исследование зависимости триптофановой флуоресценции от температуры может дать важную информацию о физико-химических свойствах белка [366] и служит косвенным методом определения его термостабильности.

Для этого регистрировали изменения интенсивности флуоресценции препаратов белков при выбранной длине волны (например, I_{340}) с ростом температуры (T), корректировали их, вычитая аналогичную кривую, прописанную в тех же условиях для буфера, не содержащего белка. После коррекции тепловой переход белков анализировали по методу, предложенному Бушуевой с соавторами [384, 385]. По исходной зависимости интенсивности триптофановой флуоресценции от температуры строили график зависимости величины $1/I_{340}$ от T/η , где T – абсолютная температура, а η – вязкость растворителя (сантипуаз, сПз). Абсолютные значения вязкости при разных температурах в интервале от 20 до 100 °С вычисляли по эмпирической формуле [386]:

$$\eta = (1,002 \cdot 10^{((1,3272 \cdot (20 - T) - 0,001053 \cdot (T - 20)^2) / (T + 105))),$$

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

Линейные участки на графике зависимости $1/I_{340}$ от T/η экстраполировали в область теплового перехода. По полученным линейным зависимостям вида $1/I_{340} = a + b \cdot (T/\eta)$ определяли предполагаемые значения интенсивностей флуоресценции I_{340}^{native} для нативного состояния (температуры ниже теплового перехода) и $I_{340}^{\text{denatured}}$ для денатурированного состояния белка (температуры выше теплового перехода). Полученные температурные зависимости I_{340}^{native} и $I_{340}^{\text{denatured}}$ использовали для расчета параметра завершенности теплового перехода (α), выраженного в долях единицы (или %), по формуле:

$$\alpha = (I_{340} - I_{340}^{\text{native}}) / (I_{340}^{\text{denatured}} - I_{340}^{\text{native}})$$

График зависимости завершенности перехода (α) от температуры T , °С использовали для определения значения характеристической температуры полуперехода для данного

белка. Использование другой длины волны при регистрации температурных изменений интенсивности триптофановой флуоресценции приводило к сходным результатам. Все преобразования и вычисления производили с помощью программы *OriginPro 8.0*.

Все измерения проводили с образцами белков (0,07-0,2 мг/мл, 450 мкл) в кюветках с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian), снабженного термодержателем Пельтье и кюветодержателем на 4 кюветы. Флуоресценцию триптофана возбуждали при 295 или 297 нм, излучение регистрировали при длине волны 320, 340 или 365 нм (для получения оптимальной величины сигнала флуоресценции в выбранном канале). Ширина щелей обоих монохроматоров, как правило, составляла 5 нм. Образцы белка нагревали и охлаждали с постоянной скоростью 1 °С/мин. Типичный буфер имел состав 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7,3, 100 мМ NaCl, 4 мМ MgCl₂ и 3 мМ МЭ. Перед измерением флуоресценции образцы были отфильтрованы через 0,22 мкм фильтры Millipore.

2.2.12.2. Изменение вторичной структуры белков при нагревании

Процесс денатурации глобулярного белка сопровождается нарушением его вторичной структуры, поэтому термостабильность белков удобно и информативно изучать с помощью спектроскопии КД. Ввиду принципиально разных по амплитуде и форме спектров КД для α -спиралей, β -складок и разупорядоченных структур, спектроскопия КД особенно выигрышна в случае исследования термостабильности и взаимодействия белков с принципиально разным составом вторичных структур [387]. Для исследования термостабильности α -спирального белка 14-3-3 в отсутствие или в присутствии белка-партнера pB6, в составе которого доминируют β -складчатые структуры и отсутствуют α -спирали, образцы 14-3-3, pB6 или их смеси инкубировали в 8 мМ буфере HEPES-NaOH (pH 7,3), содержащем 25 мМ NaCl, 0,25 мМ MgCl₂ и 2 мМ ДТТ, в течение 30 мин, а затем нагревали со скоростью 1 °С/мин в диапазоне 20-70 °С, регистрируя изменения эллиптичности при 222 нм, отражающей изменения α -спиральности. Исходные данные были преобразованы в зависимость доли свернутого белка $[(\Theta_{T,^{\circ}C} - \Theta_{70^{\circ}C}) / (\Theta_{20^{\circ}C} - \Theta_{70^{\circ}C}) * 100\%]$ от температуры (T, °С) [388]. Построив график зависимости $d[\Theta_{222}]/dT$ [388] от температуры, мы смогли для каждого образца определить зависимость разворачивания белка от температуры и таким образом определить максимум теплового перехода изолированных белков и их смесей.

Для сравнения термостабильности димерного 14-3-3 ζ WT и его мономерного мутанта ζ mS58E белки в равной концентрации (0,6-0,8 мг/мл) предварительно инкубировали в

течение 20 мин при 5 °С и затем нагревали с постоянной скоростью 1 °С/мин в диапазоне 5-75 °С с непрерывной регистрацией эллиптичности при 222 нм. Полученные данные были преобразованы в зависимость доли свернутого белка $[(\Theta_{T,^{\circ}\text{C}} - \Theta_{75^{\circ}\text{C}}) / (\Theta_{5^{\circ}\text{C}} - \Theta_{75^{\circ}\text{C}}) * 100\%]$ от температуры (Т, °С) [388], дифференцирование которой позволило определить максимальные скорости разворачивания. Альтернативно, в ходе нагревания образцов с постоянной скоростью 1 °С/мин записывали полные спектры КД с шагом 5 °С.

2.2.12.3. Дифференциальная сканирующая калориметрия

Вероятно, наиболее классическим и прямым методом исследования термостабильности белков является дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), поскольку она дает уникальное представление о процессе денатурации белковой глобулы и позволяет охарактеризовать тепловой переход с точки зрения термодинамики (температура плавления, энтальпия и кооперативность перехода) [389].

Образцы белков 14-3-3 (0,8-1,5 мг/мл), отдиализованные против 30 мМ HEPES-КОН буфера, рН 7,3, содержащего 100 мМ КСl и 1 мМ MgCl₂, анализировали в капиллярных платиновых ячейках объемом 470 мкл дифференциального сканирующего калориметра ДАСМ-4М (Институт биологического приборостроения, г. Пушкино), регистрируя зависимость избыточного теплопоглощения от температуры $C_p(t, ^{\circ}\text{C})$ при нагревании от 5 до 85 °С при постоянной скорости 1 °С/мин.

Автор глубоко признателен проф. д.б.н. Д.И. Левицкому за помощь в проведении этих экспериментов и общие консультации.

В другой серии экспериментов ДСК использовали для оценки доменной структуры фосфорилированной белок-белковой химеры 14-3-3-рВ6. Ее препарат (1,1 мг/мл) или отдельные димеры 14-3-3 и В6 (1 мг/мл каждый) диализовали в течение ночи против 20 мМ буфера HEPES-NaOH, рН 7,5, содержащего 150 мМ NaCl, и подвергали ДСК на VP-capillary DSC (Malvern) при скорости нагревания 1 °С/мин. Полученные калориметрические кривые корректировали с учетом инструментального фона, как описано ранее [390], и по максимуму теплового перехода определяли температуру перехода (T_m). Термограммы обрабатывали с использованием Origin Pro 8.0.

Автор признателен к.б.н. В.В. Михайловой за помощь в проведении этих экспериментов.

2.2.13. Химическое «сшивание» белков глутаровым альдегидом

Для исследования олигомерного состояния белков и их нековалентных комплексов широко применяется метод химического «сшивания», который сводится к ковалентной модификации определенных групп в одной или разных полипептидных цепях за счет бифункциональных химических соединений [391, 392]. Это позволяет получить ковалентный аддукт исходных молекул, не диссоциирующий даже при их полной денатурации, из-за чего за процессом «сшивания» можно удобно следить с помощью ДСН-электрофореза. Одним из наиболее популярных «сшивающих» агентов является глутаровый альдегид (ГА, $\text{ОНС-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-СНО}$), который обладает двумя альдегидными группами, разделенными гибким линкером из трех метиленовых групп, и способен модифицировать аминокетильные группы, например, боковых цепей лизина в белках, а также в составе их олигомеров и комплексов.

В типичном эксперименте исследуемые образцы белка инкубировали в буфере 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5, содержащем 150 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 15 мМ МЭ и 0,1 мМ ФМСФ, в течение 15 мин при 30 °С в отсутствие или в присутствии ГА в конечной концентрации от 0,01-0,1%, внося ГА в реакционную смесь с помощью шприца из герметично закрытого сосуда с откачанным воздухом. Реакцию останавливали добавлением Лэммли буфера, содержащего глицин, и белковый состав образцов анализировали с помощью ДСН-электрофореза в 5-20% градиентном ПААГ (см. ниже). Гели окрашивали Кумасси R-250, при необходимости подвергая денситометрии и автордиографии.

2.2.14. Шапероно-подобная активность

Антиагрегационная (или шапероно-подобная) активность проявляется в способности белков или других химических агентов подавлять агрегацию белков-субстратов, вызванную различными стрессовыми воздействиями. Экспериментально такая активность широко исследуется *in vitro* с помощью модельных систем агрегации, в которых агрегация белка-субстрата вызывается повышением температуры или другими факторами, способствующими потере белком-субстратом нативной конформации. Для характеристики антиагрегационной активности целесообразно использовать несколько белков-субстратов с различным размером, структурой, свойствами и механизмом агрегации. При этом, несмотря на свою довольно низкую специфичность (promiscuity), тот или иной белок-шаперон может более эффективно подавлять агрегацию одних белков-субстратов, и быть неактивным в отношении других, или даже стимулировать агрегацию определенных белков-субстратов.

За процессом агрегации удобно наблюдать с помощью оптических методов, которые нацелены на детектирование роста размера частиц в ходе агрегации белка. Классическим подходом является детекция статического светорассеяния (мутности) раствора с помощью измерения оптической плотности раствора на спектрофотометре. Более совершенным, но и технически гораздо более трудоемким, является метод динамического светорассеяния (ДСР) [393], при котором оказывается возможным помимо прироста общей интенсивности светорассеяния отслеживать измерения гидродинамического радиуса частиц в ходе агрегации. Наконец, довольно информативным является анализ белкового состава в растворимой и нерастворимой фракции на разных этапах агрегационного процесса с помощью ДСН-электрофореза, поскольку, подавляя агрегацию, белки-шапероны могут значительно влиять на перераспределение белка-субстрата между этими фракциями. При характеристике антиагрегационной активности исследуемого белка по отношению к выбранному белку-субстрату целесообразно сравнивать его эффект с таковым от известного белка-шаперона. В нашей работе было исследовано шапероно-подобное действие димерной и мономерной форм белка 14-3-3 ζ на несколько белков-субстратов с различным механизмом агрегации, и было проведено сравнение активности 14-3-3 ζ с таковой у некоторых представителей малых белков теплового шока.

2.2.14.1. ДТТ-индуцированная агрегация лизоцима и инсулина

Некоторые белки требуют наличия дисульфидных мостов для сохранения нативной конформации и могут быть дестабилизированы при восстановлении, что провоцирует денатурацию и агрегацию таких белков вне зависимости от других стрессовых воздействий. Влияние 14-3-3 ζ WT и 14-3-3 ζ m на агрегацию лизоцима (0,4-0,45 мг/мл; 28-32 мкМ) и инсулина (0,24 мг/мл; 42 мкМ), вызванную ДТТ, анализировали следующим образом. Модельные белки-субстраты в указанных концентрациях (конечный объем 700 мкл) инкубировали в 20 мМ буфере HEPES-NaOH, pH 7,0, содержащем 115 мМ NaCl, в отсутствие или в присутствии различных количеств 14-3-3 ζ WT, 14-3-3 ζ m или B6. Молярные концентрации белков и соотношения субстрат/шаперон рассчитывали на мономер, используя следующие молекулярные массы: 28 кДа для 14-3-3, 17,5 кДа для B6, 5,7 кДа для инсулина и 14 кДа для лизоцима. Агрегацию инициировали добавлением свежеприготовленного 1 М раствора ДТТ до конечной концентрации 20 мМ, и регистрировали изменения оптической плотности при 360 нм на спектрофотометре Cary 100 Scan (Varian), снабженном

термостатируемым держателем Biomelt для шести кювет. Отсутствие агрегации шаперонов было подтверждено в тех же условиях, но в отсутствие модельного субстрата.

Динамическое светорассеяние (ДСР) использовалось для оценки гидродинамических радиусов частиц, образующихся в процессе агрегации инсулина в отсутствие или в присутствии 14-3-3 ζ WT или 14-3-3 ζ m. Агрегация была инициирована добавлением ДТТ к предварительно инкубированному белковому раствору в условиях, описанных выше. Измерения ДСР проводили под углом 90° на лазерном фотометре Photocor (Photocor Instruments, США) с He-Ne лазером (Coherent, США, модель 31-2082, $\lambda = 632,8$ нм, мощность 10 мВт). Температура ячейки для образцов контролировалась специальным регулятором температуры с точностью до $\pm 0,1$ °С. Время накопления автокорреляционной функции составляло 30-60 с. Оценка среднего гидродинамического радиуса (R_h) частиц была выполнена с использованием программного обеспечения *DynaLS* (Alango, Израиль), а расчеты – с помощью программного обеспечения *Origin 8.0* (OriginLab).

Автор признателен к.ф.-м.н. С.Г. Роман за помощь в проведении измерений ДСР.

2.2.14.2. Индуцируемая повышением температуры агрегация дрожжевой алкогольдегидрогеназы в присутствии ЭДТА

АДГ является Zn-зависимым ферментом [394], поэтому добавление хелаторов металлов приводит к существенной дестабилизации белка, провоцируя его агрегацию при нагревании в условиях теплового шока [131].

АДГ (0,1-0,4 мг/мл; 2,7-11 мкМ) смешивали с различными количествами 14-3-3 ζ WT, 14-3-3 ζ m или В6 и предварительно инкубировали в 20 мМ буфере HEPES-NaOH, pH 7,0, содержащем 115 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА и 3,6 мМ ДТТ, в течение 10 мин при комнатной температуре. Молярные концентрации белков и соотношения субстрат/шаперон рассчитывали на мономер, используя следующие молекулярные массы: 28 кДа для 14-3-3, 17,5 кДа для В6 и 37 кДа для АДГ. Контрольные реакции не содержали ни АДГ, ни шаперонов. В конце предварительной инкубации образцы центрифугировали для уменьшения фонового светорассеяния, переносили в кюветодержатель спектрофотометра Cary 100 Scan, предварительно нагретого до 42 °С, и агрегацию АДГ регистрировали по увеличению мутности при 360 нм. В конце эксперимента образцы центрифугировали, и белковый состав супернатанта и осадка анализировали методом ДСН-электрофореза [360] с последующей количественной денситометрией в *ImageJ 1.48*.

2.2.14.3. Индуцируемая повышением температуры агрегация киназы гликогенфосфорилазы в присутствии двухвалентных катионов

Как было показано ранее, ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} индуцируют изменения третичной и четвертичной структуры гексадодекамера киназы гликогенфосфорилазы PhK (1320 кДа) и тем самым стимулируют образование олигомеров PhK высокого порядка [352, 353, 395-398]. Хотя PhK не является общепринятым модельным белком-субстратом для тестирования антиагрегационной активности, некоторые данные указывают, что малые белки теплового шока при определенных условиях взаимодействуют с PhK и предотвращают образование ее надмолекулярных структур [351, 352].

Кинетику агрегации PhK (0,1-0,2 мг/мл) при 40 °С изучали с помощью ДСР в 40 мМ HEPES-NaOH буфере, pH 6,9, содержащем 100 мМ NaCl и 0,2 мМ ДТТ. Раствор PhK либо в отсутствие, либо в присутствии белков 14-3-3 ζ WT и 14-3-3 ζ m, или малых белков теплового шока B6 и B5 предварительно инкубировали при 40 °С в течение 5 мин, а затем инициировали процесс агрегации, добавляя CaCl_2 и MgCl_2 до конечных концентраций 0,1 мМ и 10 мМ, соответственно [352]. Описание методики ДСР приведено выше.

2.2.14.4. Индуцируемая повышением температуры агрегация субфрагмента 1 миозина

Агрегацию свободного субфрагмента 1 миозина (S1) из скелетных мышц кролика (0,46 мг/мл) в отсутствие или в присутствии 14-3-3 ζ WT, 14-3-3 ζ m или B6 при различных массовых соотношениях S1:шаперон (1:0,1-1:1) в 20 мМ буфере HEPES-NaOH (pH 7,0), содержащем 115 мМ NaCl и 4 мМ ДТТ, при 43 °С контролировали, измеряя оптическую плотность при 360 нм на спектрофотометре Cary 100 UV-Vis. В этих условиях агрегация S1 начиналась через 20-30 мин после начала инкубации при 43 °С.

2.2.15. Структурные методы исследования

2.2.15.1. Рентгеноструктурный анализ

Кристаллизация образцов. Рентгеновская монокристаллическая кристаллография, или рентгеноструктурный анализ (РСА), уже много десятилетий является основным методом получения структурной информации *de novo*, опережая методы ядерного магнитного резонанса и криоэлектронной микроскопии по количеству пространственных структур, депонируемых в базу данных PDB. Несмотря на это, РСА требует получения упорядоченных кристаллов, что для белков и их комплексов является весьма трудоемким, а зачастую, просто невозможным.

В работе были получены кристаллические структуры различных комплексов и химерных конструкций на основе 14-3-3. Кристаллизация белок-пептидных комплексов проводилась при смешивании очищенных препаратов белков с 1,2-6-кратным молярным избытком пептида непосредственно перед смешиванием с растворами осадителей, а кристаллизация белок-белковых комплексов и химер осуществлялась сразу после финальной очистки препаратов с помощью гель-фильтрации. Для того чтобы гарантировать стехиометричность и полноту образования комплексов, смеси белков, наносимые на ГФ колонку Superdex 200 16/600 (GE Healthcare), содержали 1,2-1,5-кратный молярный избыток того компонента комплекса, который наилучшим образом отделялся от комплекса во время элюции. Основной пик, по данным ДСН-электрофореза соответствующий исследуемому комплексу или химере, концентрировали, центрифугировали и использовали для кристаллизации. Поиск условий кристаллизации проводился в 96-луночных MRC планшетах с 2 каплями (SWISSCI, Швейцария) с помощью коммерчески доступных наборов растворов JCSG+ (Molecular Dimensions), Wizard I+II (Emerald BioStructures), Index, Crystal Screen (Hampton Research), Procomplex, PACT (Qiagen) при диффузии в парах, методом сидячей капли. Перебор большого количества условий производился с помощью робота Mosquito (TTP Labtech, Великобритания). Планшеты герметично закрывали оптически прозрачными пленками и хранили в роботизированных хранилищах RockImager 1000 (Formulatrix) или Rigaku, позволяющих производить периодическую съемку капель для облегчения обнаружения кристаллизации. Комплекс Rigaku также позволял сканировать кристаллизационные капли одновременно в видимом и УФ каналах, чтобы отличать кристаллы белковой и солевой природы.

Обнаруженные при первичном скрининге кристаллы оптимизировали вручную в 24-луночных планшетах методом висячей капли. Кристаллы химер 14-3-3 в основном не

требовали оптимизации. В итоге были найдены оптимальные условия кристаллизации и получены кристаллы для различных комплексов (Табл. 12), а также химер на основе 14-3-3 (Табл. 13 и Табл. 14). Наиболее оптимальные кристаллы были выловлены с помощью нейлоновых петель и мгновенно заморожены в жидком азоте.

Табл. 12. Условия кристаллизации комплексов, полученных в работе.

Комплекс	14-3-3σ Clu3 (1-231) / пептид pB6(13-20)	14-3-3σ WT (1-231) / пептид pB6(11-23)	14-3-3σ Clu1 (1-231) / pB6(1-149)	14-3-3σ Clu1 (1-231) / pB6(7-153)	B6 АКД / N-пептид (2-10)	14-3-3σ Clu1 (1-231) / пептид p16E6(142-151)
Раствор осадителя*	0,1 М бис-Трис пропан (pH 6,5), 0,2 М NaNO ₃ , 20% ПЭГ 3350	0,1 М HEPES (pH 7,5), 0,2 М MgCl ₂ , 30% ПЭГ 400	0,1 М HEPES (pH 7,5), 0,2 М LiCl, 17% ПЭГ 6000, 2мМ ДТТ	0,1 М HEPES (pH 7,5), 20% ПЭГ 8000, 2мМ ДТТ	0,1М Tris-HCl (pH 6,5), 1,5М (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1М NaCl	0,1М бис-Трис пропан (pH 6,5), 0,2 М K/Na-тарtrate, 20% ПЭГ 3350
Концентрация белка (мг/мл)	11,5	11,5	23	20	15	12
Температура (°C)	20	4	4	20	20	4
Время роста (дни)	2-5	5	5	10	14	14

*-для всех кристаллов в качестве криопротектора использовался 15-20% этиленгликоль

Табл. 13. Условия кристаллизации химер pCH1-pCH3. Номенклатура названий химер приведена в Табл. 10.

Химера	pCH1			pCH2	pCH3 *
Раствор осадителя	0,1 М ММТ (малат-MES-Tris) pH 4, 25% ПЭГ 1500	0,1 М Na-ацетат pH 4,6, 20 мМ CaCl ₂ , 30% МПД	0,1 М HEPES pH 7,5, 1 М Na-ацетат, 50 мМ CdSO ₄	0,1 М бис-Трис (pH 6,5), 2 М (NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 М бис-Трис пропан (pH 6,5), 0,2 М (NH ₄) ₂ SO ₄ , 25% ПЭГ 3350
Криораствор	-	-	-	20 мМ Tris pH 7,5, 0,1 М бис-Трис pH 6,5, 2,4 М (NH ₄) ₂ SO ₄ , 150 мМ NaCl, 20% глицерол	-
Разрешение, Å	2,35	2,5-3,3	3,2	3,2	3,9
Концентрация белка (мг/мл)	23	23 (сидинг)	23	20,6	10,1
Температура (°C)	20	20	20	20	20
Время роста (дни)	8-12	1-4	3-6	8-14	7-10

*-кристаллизовалась в виде комплекса 14-3-3 с фосфорилированным линкером GSGpS

МПД – 2-метил-2,4-пентандиол;

MES – 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid;

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethane.

Табл. 14. Условия кристаллизации химер рСН3-рСН7. Номенклатура названий химер приведена в Табл. 10.

Химера	рСН3	рСН4	рСН5	рСН7	рСН7+Fc
Раствор осадителя	0,09 М смесь буферов (0,3 М Na-нитрат, 0,3 М Na-фосфат, 0,3 М (NH ₄) ₂ SO ₄), 0,1 М смесь буферов (1,0 М имидазол; MES), 25% v/v МПД; 25% ПЭГ 1000; 25% w/v ПЭГ 3350, рН 6,5	20% w/v ПЭГ 3350	0,1 М смесь буферов (Na-малонат, имидазол, борная кислота), 25% w/v ПЭГ 1500, рН 7,0	19% ПЭГ 4000, 0,1 М какодилат рН 5,5	19% ПЭГ 4000, 0,1 М какодилат рН 5,5 + вымачивание в 5 mM растворе фузикокина (пересыщенный) в течение 18 ч
Криораствор	-	-	-	20% глицерин	20% глицерин
Разрешение, Å	2,04	2,63	2,99	1,90	1,85
Концентрация белка (мг/мл)	13,1	21,3	11,5	27	27
Температура (°C)	6	6	20	4	4
Время роста (дни)	36	20	30	20	вымачивание 18 ч

Сбор и обработка рентгеновских данных. Дифракционные данные собирали при температуре 100 К с использованием синхротронного излучения на различных синхротронах, как указано в Табл. 15. Дифракционные данные для каждого набора были интегрированы и шкалированы с использованием *XDS/Xscale* [399] и *xdsme* [400]. Статистика для каждого образца приведена в Табл. 16 и Табл. 17.

Решение и уточнение кристаллических структур. Решение структур комплексов 14-3-3σ с фосфопептидами В6 было найдено путем молекулярного замещения в *MolRep* [401] с использованием димера 14-3-3σ из структуры PDB 3IQJ в качестве поисковой модели. Пептиды были построены *de novo* на основе карт разностной электронной плотности. Структура комплекса В6 АКД с N-концевым пептидом В6 (остатки 2-10) была решена с использованием АКД из кристаллической структуры фрагмента В6 Δ56 (код PDB 4JUT), пептид был достроен *de novo*. Автоматическое уточнение проводилось с помощью *Buster 2.10.3* [402]. Ручная коррекция модели производилась в *Coot* [403]. Статистика качества уточненных моделей приведена в Табл. 16.

Структура комплекса 14-3-3σ Clu1(1-231)/pB6(1-149) была решена с помощью *MolRep* [401] с использованием комплекса димера 14-3-3σ со связанными фосфопептидами pB6(13-20) как поисковой модели, что привело к нахождению в независимой части элементарной ячейки трех таких димеров. После этого, поиск в *MolRep* в реальном пространстве (то есть в карте, рассчитанной с использованием доступных фаз) с использованием димера В6 АКД из

структуры 4JUT позволил позиционировать три димера В6 АКД. Недостающие N-концевые области В6 были добавлены в *Coot* [403] на основе карт разностной электронной плотности. Последующее уточнение в *Buster* включало позиционное уточнение всех цепей как жестких тел, после чего следовало уточнение всех атомов с дополнительными ограничениями, накладываемыми некристаллографической симметрией, а также относительными координатами атомов, взятыми из структур с более высоким разрешением. Для этого использовали уточненные структуры комплексов 14-3-3σ/pB6(13-20) (разрешение 2,4 Å) и В6 АКД/В6(2-10) (разрешение 2,6 Å). Только общие температурные факторы и параметры TLS для каждого домена были включены в уточнение. После того как структура комплекса 14-3-3σ Clu1(1-231)/pB6(**1-149**) была установлена, используя уточнение жестких тел, мы смогли также получить абсолютно изоморфные структуры по экспериментальным данным для комплексов 14-3-3σ Clu1(1-231)/pB6(**1-160**) и 14-3-3σ Clu1(1-231)/pB6(**7-153**), однако дальнейшее уточнение в этих случаях не было проведено из-за ограниченного разрешения (<7Å). В Табл. 16 представлены статистические и другие данные, полученные при решении и уточнении структуры только комплекса 14-3-3σ Clu1(1-231)/pB6(**1-149**).

Кристаллическая структура комплекса 14-3-3σ Clu1(1-231) с фосфопептидом 16Е6 была решена молекулярным замещением с использованием кристаллической структуры димера 14-3-3σ (PDB ID 5LU2) без пептидов с использованием *Phaser* [404]. Уточнение структуры было выполнено с помощью *PHENIX* [405] с использованием TLS групп. Статистика качества уточненных моделей приведена в Табл. 16.

Фазирование при решении кристаллических структур химер pCH1-pCH5 осуществляли путем молекулярного замещения в *MolRep* [401] с использованием 14-3-3σ Clu3 из кристаллической структуры его комплекса с фосфопептидами pB6 (код PDB 5LU1) в качестве поисковой модели. После нахождения решения фосфопептиды были достроены *de novo* путем ручного размещения соответствующих аминокислотных остатков в карте разностной электронной плотности в *Coot* [403]. Начальные попытки фазирования в случае pCH3* с использованием димера 14-3-3σ не увенчались успехом. Тем не менее, нам удалось решить структуру, используя мономер 14-3-3σ в качестве поисковой модели. В этом случае молекулярное замещение в *MolRep* [401] позволило позиционировать три из четырех субъединиц в независимой части. Четвертая субъединица, которая имела существенно более открытую конформацию, была построена в *Coot* [403] вручную путем размещения модельных α-спиралей в карту электронной плотности, рассчитанную с фазами на основе трех уже позиционированных мономеров 14-3-3. Далее, связанные фосфопептиды и сульфат-

анионы были вручную встроены в карту разностной электронной плотности. Автоматическое уточнение в *Buster 2.10.3* [402] вначале включало уточнение положения всех цепей как жестких тел, а затем уточнение с использованием ограничений по геометрии и индивидуальных В-факторов. Статистика окончательно уточненных моделей химер приведена в Табл. 17. Относительно высокие R-факторы в случае структуры pCH1** были вызваны выраженной трансляционной некристаллографической симметрией (tNCS), обнаруженной для этой кристаллической формы, что значительно усложнило уточнение. В этом случае мы использовали программу *Zanuda* [406] для проверки корректности определения пространственной группы $P2_12_12_1$ перед уточнением.

Табл. 15. Некоторые параметры сбора кристаллографических данных на синхротронах.

Кристалл	λ , Å	Детектор	Станция	Синхротрон
14-3-3 σ Clu3 (1-231) / пептид pB6(13-20)	0,98	ADSC Quantum 315 Eiger 9M	PROXIMA 2a	Soleil (Франция)
14-3-3 σ WT (1-231) / пептид pB6(11-23)	0,98			
14-3-3 σ Clu1 (1-231) / pB6(1-149)	0,98			
14-3-3 σ Clu1 (1-231) / pB6(7-153)	0,98			
B6 АКД / N-пептид (2-10)	0,98			
14-3-3 σ Clu1 (1-231) комплекс с фосфатом	0,98			
pCH1	0,98	PILATUS 6MF	I02 I04	Diamond Light Source (Великобритания)
pCH2	0,98			
pCH3 *	0,93			
pCH3	0,92			
pCH4, pCH5	0,98	PILATUS 6MF	I04-1	
pCH7	1,00	PILATUS 2M-F	X06DA (PXIII)	Swiss Light Source (Швейцария)
pCH7+Fc	1,00			
14-3-3 σ Clu1 (1-231) / пептид p16E6(142-151)	1,00			

Табл. 16. Статистика кристаллографических данных для комплексов, полученных в работе.

<i>Сбор и обработка данных</i>	комплекс 14-3-3σ Clu3 (1-231) / пептид pB6 (13-20)	комплекс 14-3-3σ WT (1-231) / пептид pB6 (11-23)	комплекс 14-3-3σ Clu1 (1-231) / pB6 (1-149)	комплекс B6 АКД / пептид 2-10	комплекс 14-3-3σ Clu1 (1-231) / пептид p16E6 (142-151)
Код PDB	5LU1	5LU2	5LTW	5LUM	6TWZ
Пространственная группа	$P2_1$	$C2$	$C222_1$	$P3_122$	$C121$
Параметры ячейки: a, b, c (Å)	55,6, 104,0, 123,1	90,1, 79,0, 75,4	125,1, 341,3, 144,6	105,7, 105,7, 112,0	178,58, 107,42, 79,6
Углы ячейки: α, β, γ (°)	90, 93,9, 90	90, 102,5, 90	90, 90, 90	90, 90, 120	90, 109,289, 90
Пределы разрешения (Å)*	48 - 2,4 (2,46-2,4)	43 - 2,5 (2,56-2,5)	48 - 4,5 (4,62-4,5)	48 - 2,6 (2,67-2,6)	45,29 - 2,8 (2,7-2,8)
R_{meas} **	0,116 (1,79)	0,175 (2,12)	0,337 (2,23)	0,093 (2,81)	0,13 (1,69)
$\langle I / \sigma \rangle$	8,6 (0,9)	7,1 (0,9)	5,8 (1,1)	18,2 (0,9)	13,23 (1,2)
$CC_{1/2}$	1,00 (0,62)	1,00 (0,60)	0,99 (0,34)	1,00 (0,51)	99,9 (45,8)
Полнота (%)	99,7 (100)	99,6 (100)	99,6 (99,9)	100 (100)	99,2 (99,1)
Избыточность	3,7 (3,8)	3,7 (3,8)	7,9 (8,1)	11,3 (11,3)	6,9 (7,2)
Уточнение					
Число уникальных рефлексов: общее	54511	17876	18722	22684	34826
‘free’ набор	2718	1040	934	1097	1761
R_{work} (%)	18,5	20,9	23,6	20,7	20,3
R_{free} (%)	21,4	25,0	25,6	22,7	23,6
Число 2:2 комплексов / НЧ	2	1	3	2,5	2
Число атомов (не H): белок/лиганды/растворитель	7409 / 32 / 361	3733 / 0 / 127	15845 / 48 / 0	3375 / 20 / 14	7527 / 59 / 0
R.m.s.d. длины связи (Å)/ углы (°)	0,010 / 1,6	0,010 / 1,2	0,008 / 1,1	0,010 / 1,3	0,003 / 0,55
Карта Рамачандрана удовл. / выбросы (%)	97,7 / 0,1	97,4 / 0,2	93,9 / 0,8	95,4 / 0,5	98,16 / 0,11

* Цифры указывают общий диапазон на всем разрешении, цифры в скобках показывают значения для данных с наибольшим разрешением.

** Статистика приведена на основе выдачи XSCALE [399]. НЧ – независимая часть элементарной ячейки.

Табл. 17. Статистика кристаллографических данных для химер, полученных в работе. Номенклатура названий химер приведена в Табл. 10.

<i>Сбор и обработка данных</i>	pCH1	pCH1 **	pCH2	pCH3 *	pCH3	pCH4	pCH5	pCH7	pCH7+Fc
Код PDB	5OK9	5OKF	5OM0	5OMA	6T80	6T5H	6T5F	6ZFD	6ZFG
Пространственная группа	<i>P 1 2₁ 1</i>	<i>P 2₁ 2₁ 2₁</i>	<i>P 6₃ 2 2</i>	<i>P 4₁ 2₁ 2</i>	<i>P 1 2₁ 1</i>	<i>C 1 2 1</i>	<i>P 1 2₁ 1</i>	<i>P 2₁ 2₁ 2₁</i>	<i>P 2₁ 2₁ 2₁</i>
Параметры ячейки: <i>a, b, c</i> (Å)	63,6,140,6,68,7	77,4, 97,8, 158,8	110,4,110,4,174,1	123,3, 123,3,162,4	75,3, 74,1, 102,1	90,2, 78,4, 76,1	77,2, 74,9, 104,4	72,4, 78,5, 90,3	73,2, 76,1, 88,9
Углы ячейки: <i>α, β, γ</i> (°)	90, 114,8, 90	90, 90, 90	90, 90, 120	90, 90, 90	90, 96,03, 90	90, 100,42, 90	90, 97,98, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Пределы разрешения (Å) ***	47 - 2,35 (2,51-2,35)	46,5 - 3,20 (3,31-3,20)	48 - 3,19 (3,38-3,19)	49 - 3,89 (4,12-3,89)	74,74 - 2,99 (3,07-2,99)	49,14 - 2,04 (2,11-2,04)	53,51 - 2,63 (2,72-2,63)	39,26 - 1,90 (1,95 - 1,90)	38,05 - 1,85 (1,9 - 1,85)
<i>R</i> _{meas} ****	0,20 (1,4)	0,49 (3,4)	0,23 (4,4)	0,30 (3,1)	0,25 (1,3)	0,122 (1,50)	0,170 (1,59)	0,17 (2,05)	0,16 (2,16)
<i><I / σ></i>	6,5 (1,2)	4,4 (0,7)	14,3 (0,9)	6,8 (1,0)	3,8 (1,2)	8,4 (1,1)	5,4 (1,1)	13,19 (1,39)	12,36 (1,40)
<i>CC_{1/2}</i>	0,99 (0,5)	0,99 (0,3)	1,00 (0,5)	1,00 (0,3)	0,99 (0,49)	1,0 (0,55)	0,99 (0,48)	99,9 (54,7)	99,8 (58,4)
Полнота (%)	95,5 (84,6)	99,8 (99,9)	99,6 (98,2)	99,6 (98,4)	99,9 (99,9)	99,7 (99,8)	99,9 (99,6)	100 (100)	97,1 (96,5)
Избыточность	3,9 (3,8)	6,5 (6,7)	23,0 (22,3)	12,8 (12,7)	4,0 (3,9)	4,2 (4,1)	4,0 (4,0)	13,3 (12,6)	13,3 (13,6)
Уточнение									
Число уникальных рефлексов: общее	43838	20548	10910	12947	22756	33161	35345	41285	41927
‘free’ набор	1385	1016	977	1049	1080	1632	1811	2986	3038
<i>R</i> _{work} (%)	19,1	24,7	21,5	20,9	20,0	18,5	21,7	17,6	19,1
<i>R</i> _{free} (%)	24,0	27,9	26,7	24,8	25,1	22,9	26,0	20,7	21,9
Число 2:2 комплексов / НЧ	2	2	1	2	2	1	2	1	1
Число атомов (не H): белок/лиганды/растворитель	8071 / 35 / 493	7327 / 17 / 22	3655 / 40 / 7	7246 / 38 / 1	7198 / 40 / 2	3729 / 55 / 345	7515 / 40 / 111	4034 / 24 / 410	4004 / 102 / 483
R.m.s.d. длины связи (Å)/ углы (°)	0,010 / 1,0	0,010 / 1,0	0,010 / 1,1	0,010 / 1,1	0,010 / 1,0	0,010 / 1,0	0,010 / 1,0	0,006 / 0,83	0,006 / 0,71
Карта Рамачандрана: удовл. / выбросы (%)	97,7 / 0,1	98,1 / 0,1	96,0 / 0,4	96 / 0,6	96,9 / 0,1	98,3 / 0,0	96,6 / 0,1	99,36 / 0	98,51 / 0

*структура химеры pCH3, в которой наблюдается связывание фосфорилированного линкера GSGpS в АБ 14-3-3.

структура химеры pCH1, в которой **не наблюдается обмен фосфопептидами между соседними димерами.

*** Цифры указывают общий диапазон на всем разрешении, цифры в скобках показывают значения для данных с наибольшим разрешением.

**** Статистика приведена на основе выдачи XSCALE [399]. НЧ – независимая часть элементарной ячейки.

2.2.15.2. Малоугловое рассеяние рентгеновских лучей

Метод малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (МУРР) широко применяется для анализа гидродинамических и структурных свойств белков и их комплексов в растворе, а также позволяет анализировать их структуру и конформацию при моделировании на основе экспериментальных данных МУРР [407-409]. Являясь одним из самых мощных и точных методов для определения размера и формы макромолекул в растворе, т.е. в условиях близких к физиологическим, МУРР тем не менее является структурным методом низкого разрешения и лучше подходит для проверки тех или иных гипотез о конформации, чем для получения структурной информации *de novo*. Вследствие ограниченности структурной информации и значительной вырожденности (*ambiguity*), данные МУРР стоит использовать с осторожностью и дополнять структурной информацией, полученной с помощью других методов, накладывающих ограничения при моделировании (кристаллографические модели, данные по химическому «сшиванию», ограниченному протеолизу, аналитическому ультрацентрифугированию и т.д.) [410].

Суть метода МУРР заключается в том, что монохроматический когерентный пучок рентгеновского излучения с длиной волны порядка 1 \AA при взаимодействии с электронной плотностью образца претерпевает рассеяние, анализ которого дает информацию о распределении электронной плотности в молекулах образца. Источником необходимого излучения, как правило, служит синхротрон, что обеспечивает излучение крайне высокой интенсивности. Очевидно, что при измерении МУРР от молекул белка в растворе основной пучок рентгеновского излучения будет беспрепятственно проходить насквозь образца, и лишь небольшая часть фотонов будет рассеиваться на веществе, причем картина рассеяния будет интегральным результатом усредненного рассеяния на всех частицах образца, повернутых под произвольными углами к пучку. При детекции результата рассеяния с помощью чувствительных детекторов, расположенных на удалении от образца в плоскости, перпендикулярной направлению распространения пучка, падающего на образец, оказывается, что интенсивность рассеянного излучения довольно резко падает от центра (нулевой угол) к периферии. Таким образом, рабочая область, в основном, составляет малые углы, причем усреднение интенсивности по радиусу дает одномерную кривую – профиль МУРР (зависимость интенсивности от удаления от центра, или от так называемого вектора рассеяния, который характеризует угол отклонения направления рассеяния от направления распространения пучка, падающего на образец). Оказывается, что размер и форма частиц

драматическим образом влияет на форму профиля МУРР. Соответственно, зная или предполагая размер и форму частиц в монодисперсном растворе исследуемой макромолекулы, можно пытаться рассчитать теоретический профиль МУРР для таких частиц и тем самым описать наблюдаемую ситуацию, сравнивая теоретический и экспериментальный профили МУРР с помощью статистических критериев.

Поскольку корректность и точность определения структурных параметров частиц в образце будет напрямую зависеть от его чистоты и монодисперсности, а наличие в образце нежелательных примесей и агрегатов также будет давать вклад в анализируемый профиль МУРР, сравнительно недавно стали применять сочетание детекции МУРР с непосредственным разделением частиц по размеру с помощью гель-фильтрации. Такой подход позволяет в режиме реального времени разделять образец на фракции и анализировать структурные свойства частиц в разных фракциях независимо друг от друга [411-413]. Более традиционным вариантом является измерение рассеяния для серии растворов образца в широком диапазоне концентраций с последующим анализом концентрационных зависимостей.

В работе использовали оба подхода. В одном случае, регистрировали профили МУРР для серии концентраций образцов, представленных олигомерными формами, устойчивыми к образованию полидисперсных ассоциатов и агрегатов. В другом случае проводили предварительное разделение частиц на ГФ колонках, детектируя профили элюции спектральными методами и с помощью синхротронного МУРР.

Данные МУРР для комплекса белков 14-3-3 σ (1-231) и pB6(1-149), заранее очищенного с помощью ГФ, в различных концентрациях (1-9 мг/мл) в 50 мМ Трис-буфере (рН 7,5), содержащем 150 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и 2 мМ ДТТ, были зарегистрированы для диапазона значений вектора рассеяния $0 < s < 0,5 \text{ \AA}^{-1}$, где $s = 4\pi \sin\theta/\lambda$, а θ – угол рассеяния. Данные собирали при 283 К с использованием рентгеновского излучения с длиной волны 1,2 \AA на станции BM29 (ESRF, Гренобль), оснащенной детектором Pilatus 1M (Dectris, Швейцария). Значительного радиационного повреждения обнаружено не было. Несмотря на то, что зависимость профилей МУРР, нормализованных по концентрации, от концентрации образца была незначительной, для того чтобы избежать влияния взаимодействия частиц комплекса друг с другом, была произведена экстраполяция в область бесконечного разбавления, и получен идеализированный профиль МУРР с использованием программы *Almerge* из пакета *ATSAS 2.6* [414, 415]. Чтобы создать полноатомную модель комплекса, кристаллическая структура была сначала дополнена C α -атомами частей N-концевого домена

белка B6 (NTD), отсутствующих в кристаллической структуре 5LTW, используя несколько прогонов программы *CORAL* [414], при оптимизации соответствия экспериментальным данным МУРР в диапазоне $0 < s < 0,3 \text{ \AA}^{-1}$. Это включало остатки 39-69 в цепи B6 типа I и остатки 1-12 и 21-69 в цепи B6 типа II, что в сумме составляло $\sim 11\%$ массы комплекса. Полученные модели были валидированы относительно кривой МУРР для всего диапазона данных рассеяния с использованием программы *CRYSOL* [416]. Эта процедура показала хорошую сходимость, так как набор полученных моделей дал хорошее соответствие экспериментальным данным, со значениями χ^2 в диапазоне от 2,3 до 3,8 и радиусами гирации (R_g) от 30,6 до 30,7 \AA . После этого, для модели с наименьшим значением χ^2 , цепи, состоящие из одних только Ca атомов, полученные на выходе программы *CORAL* [414], были преобразованы в полноатомную модель с достройкой недостающих атомов с помощью *BBQ* пакета *Bioshell* [417] и программы *Scwrl 4.0* [418], в результате чего окончательное значение χ^2 составило 2,2.

Кроме того, мы заметили, что размер димера АКД хорошо соответствует полости, образованной димером 14-3-3, и проверили качество описания данных МУРР моделью, полученной при докинге АКД в полость димера 14-3-3. Однако даже после моделирования отсутствующих частей NTD с использованием *CORAL* такая альтернативная модель не смогла обеспечить сколь-нибудь значимое описание экспериментальных данных МУРР ($\chi^2 > 169$).

Метод МУРР применяли для исследования конформации химеры 14-3-3-pB6. Поскольку данный белок показал способность образовывать несколько олигомерных форм, для исследования конформации интересующей нас димерной формы мы использовали гель-фильтрацию с многопараметрической детекцией, включая МУРР. Данные МУРР для химеры 14-3-3-pB6 были получены параллельно с детекцией MALLS и изменения показателя преломления RI при хроматографическом разделении препарата химеры (75 мкл, 10,14 мг/мл) на гель-фильтрационной колонке Superdex 200 Increase 10/300 (GE Healthcare) при 20 °C и скорости потока 0,5 мл/мин на станции EMBL P12 (PETRA III, DESY Гамбург, Германия [419]). Параллельная, абсолютно синхронная детекция осуществлялась за счет разделения потока элюата с ГФ колонки поровну между МУРР (длина волны 1,24 \AA , 3600 кадров по 1 с) и модулями детекции MALLS/RI [420]. Колонка была уравновешена 20 mM буфером Tris-HCl, pH 7,5, содержащим 150 mM NaCl, 0,1 mM ЭДТА, 5 mM ДТТ и 3% глицерол. Первичная обработка данных рассеяния, радиальное усреднение и статистический анализ были выполнены с использованием *SASFLOW* [421], обработка данных профиля

элюции, построенного по изменению интенсивности МУРР, и получение усредненного и отшкалированного профиля МУРР для пика димера 14-3-3-pB6 химеры были произведены с использованием *CHROMIXS* [422]. Пакет программного обеспечения *ATSAS 2.8* [415] использовали для анализа и моделирования данных. *PRIMUS* [423] использовался для анализа данных на участке Гинье, по которому были определены радиус гирации R_g и интенсивность рассеяния, экстраполированная на нулевой угол I_0 (область Гинье была линейной в координатах $\ln I(s)$ от s^2 и стандартном диапазоне данных). Функция распределения межатомных расстояний в реальном пространстве, $p(r)$, была рассчитана с использованием программы *GNOM* [424], которая позволила сделать дополнительные оценки значений R_g и I_0 и максимального размера частиц, D_{max} . Объем Порода и другие структурные параметры, определенные в эксперименте, представлены в Табл. 29.

Перед моделированием конформации химеры 14-3-3-pB6 на основе данных МУРР, кристаллическая структура химеры 14-3-3 с фосфопептидом белка B6 (остатки 12-19) (код PDB 5OKF) вначале была дополнена в *Coot* [403] за счет добавления остатков линкера и некоторых остатков гибких петель, отсутствующих в карте электронной плотности. Это привело к построению полноатомной модели димерного ядра 14-3-3 (остатки GPH, затем остатки 1-231 14-3-3σ человека с мутациями Clu3), связанного с фосфопептидом B6 (остатки 12-20) с помощью GSGS линкера (полная длина – 247 остатков). Димерная часть B6 АКД (остатки 72-153) была взята из кристаллической структуры комплекса белка B6 с 14-3-3σ (код PDB 5LTW). Первый сценарий моделирования конформации химеры основывался на такой же взаимной ориентации ядра 14-3-3 и димера АКД, как наблюдается в структуре 5LTW (с сохранением интерфейса 14-3-3/АКД и гибкими N-концевыми доменами B6). Второй сценарий подразумевал свободные перемещения димера АКД, привязанного к 14-3-3 за счет связывания N-концевых фосфопептидов обеих субъединиц HSPB6 с амфипатическими бороздками 14-3-3. В третьем сценарии рассматривалось симметричное ядро, состоящее из димера 14-3-3 с двумя мономерами АКД, присоединенными к C-концевым α-спиралям субъединиц 14-3-3. Во всех случаях программа *CORAL* [414] использовалась в нескольких параллельных прогонах для моделирования структуры полной димерной химеры 14-3-3-pB6 (2 полипептидных цепи по 380 остатков) путем достройки недостающих частей N-концевого домена B6 (остатки 21-71) в обеих цепях (12,7% по массе) так, чтобы минимизировать несоответствие между экспериментальным профилем МУРР в диапазоне $0 < s < 0,3 \text{ \AA}^{-1}$ и профилем МУРР, рассчитанным по моделям. Полученные модели были проверены на соответствие экспериментальной кривой МУРР для всего диапазона

данных рассеяния с использованием *CRY SOL* [416]. Два возможных способа соединения фосфопептидов, связанных с 14-3-3, и двух субъединиц В6 АКД, привели к качественно эквивалентным моделям, одинаково хорошо описывающим данные.

Профиль МУРР, графики Кратки и функция распределения межатомных расстояний для полноатомной модели комплекса 14-3-3σΔC–pB6ΔC на основе кристаллической структуры 5LTW, дополненной отсутствующими петлями, были рассчитаны с использованием *CRY SOL* [416] и *GNOM* [424].

Структурные параметры и конформация мутантной формы 14-3-3ζmS58E были исследованы с помощью МУРР на станции SWING (синхротрон SOLEIL, Франция) с использованием встроенной системы ВЭЖХ для нанесения и разделения образцов непосредственно перед сбором данных МУРР. Образец белка (50 мкл, 7,5 мг/мл) загружали при скорости потока 0,2 мл/мин при 20 °С на колонку KW404-4F (Shodex, Япония), предварительно уравновешенную 20 мМ буфером Трис-НСl, рН 7,5, содержащим 150 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и 2 мМ ДТТ. Во время хроматографического разделения собирали данные МУРР как для буфера, так и для белка. Для буфера было собрано 90 кадров, начиная с 5 мин после введения образца (время экспозиции – 1,5 с; пауза – 0,5 с). Для белка было собрано 240 кадров, начиная с 13 мин после инъекции, при таких же параметрах экспозиции. Кадры буфера были обработаны, усреднены и вычтены из каждого кадра белка с использованием программного обеспечения *Foxtrot*, доступного на станции SWING. При сравнении разных кадров, снятых для белка, значительного радиационного повреждения выявлено не было. На протяжении всего профиля элюции рассчитывали радиус гирации (R_g), интенсивность рассеяния при нулевом угле (I_0), объем Порода и молекулярную массу (M_w) для каждой кривой МУРР белка, скорректированной с учетом рассеяния от буфера, с использованием программы *DATASW* 0.9 (<http://www.saxier.org/forum/viewtopic.php?f=5&t=2389>), любезно предоставленной д-ром А.В. Шкуматовым (Лаборатория биокристаллографии, К.У. г. Лёвен). Позднее этот функционал был использован в программе *CHROMIXS* [422].

Несколько кривых МУРР для белка, соответствующих максимуму его пика элюции, были масштабированы до кривой с максимальным значением I_0 и затем усреднены с использованием *PRIMUS* [423]. Полученная кривая МУРР использовалась для дальнейшего анализа и моделирования с помощью пакета программ *ATSAS* [414].

Интенсивность рассеяния при нулевом угле I_0 и радиус гирации R_g были рассчитаны с использованием приближения Гинье с помощью функции *AutoRg* [414]. Функция

распределения $p(r)$ с соответствующими параметрами (D_{\max} и R_g) была рассчитана с использованием *GNOM* [424]. Молекулярную массу (M_w) рассчитывали, используя объем корреляции, V_c , параметр, который подходит для оценки молекулярной массы не только для компактно свернутых белков, но и для гибких систем [425]. V_c определяли как отношение интенсивности рассеяния при нулевом угле I_0 к общей интенсивности рассеяния, определенной как интеграл $q * I(q)$ от q [425], в диапазоне q от 0 до $0,3 \text{ \AA}^{-1}$. Полученное значение V_c было использовано для расчета M_w с использованием эмпирически найденной зависимости: $M_w = QR/0,1231$, где $QR = V_c^2 * R_g^{-1}$ [425].

Анализ компактности/гибкости был выполнен с помощью безразмерного графика Кратки ($q^2 * R_g^2 * I(q)/I_0$ от $q * R_g$), где значения R_g и I_0 для обратного пространства были определены с использованием приближения Гинье.

Десять независимых моделей, состоящих из шариков и построенных *ab initio* (непосредственно из данных, без каких-либо допущений), были созданы с использованием *DAMMIN* [426] на основе кривой рассеяния в диапазоне q от 0 до $0,3 \text{ \AA}^{-1}$, а затем выровнены и усреднены с использованием *DAMAVAR* [427] с параметрами по умолчанию. Расчет теоретических кривых рассеяния и подгонка к экспериментальным данным проводились с использованием *CRY SOL* [416]. Структурная гибкость белка 14-3-3 ζ mS58E была исследована с использованием *Ensemble Optimization Method (EOM)* [428]. Этот подход предполагает, что гибкие части белка сосуществуют в растворе в нескольких энергетически эквивалентных конформациях, каждая из которых дает свой вклад в рассеяние. Процедура *EOM* была выполнена в два этапа. Вначале *RANCH* [414, 428] был использован для создания 4 библиотек по 10 000 конформеров субъединицы белка 14-3-3 в каждой, в которых 0, 19, 39, или 59 первых N-концевых остатков были сделаны гибкими, а другая часть субъединицы была зафиксирована и соответствовала кристаллической структуре 14-3-3 ζ (код PDB 4N7Y). Эта кристаллографическая структура была взята из-за наличия в модели одного мономера всех петель и спиралей от 1 до 230 остатка. Во всех четырех библиотеках *EOM* с различным размером гибкой N-концевой области C-конец (остатки 231-245), который, как известно, неструктурирован в 14-3-3 ζ [131, 223], всегда моделировался как гибкий. На втором этапе 10 повторений генетического алгоритма *GAJOE* [414, 428] были использованы для выбора ансамбля конформеров, чье среднее расчетное рассеяние давало наилучшее соответствие экспериментальным данным в диапазоне до $0,5 \text{ \AA}^{-1}$.

2.2.15.3. Предсказание склонности белков к структурной разупорядоченности

Важными структурными элементами многих белков являются внутренне-разупорядоченные участки (IDR), которые зачастую выполняют уникальные функциональные задачи [10, 429-431]. Анализ многочисленных белков, лишенных четкой пространственной структуры, показал, что аминокислотный состав их последовательностей существенно отличается от упорядоченных глобулярных белков. Эти различия лежат в основе многочисленных алгоритмов, помогающих выявить склонность тех или иных последовательностей к разупорядоченности структуры (intrinsic disorder, ID).

В настоящей работе проводили детальный анализ последовательностей белков 14-3-3 человека и других организмов, доступных в базе данных UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org/uniprot>), на предмет склонности тех или иных участков их структуры к ID. Проанализированные последовательности с соответствующими идентификаторами в Uniprot представлены в *Дополнении 1*. Анализ проводили с помощью нескольких предсказателей: *PONDR® VSL2B* [432], *PONDR® VLXT* [160], *PONDR® VL3* [433], *PONDR FIT* [434], *IUPred* [435] и *RONN* [436]. Величины оценки предсказания выше 0,5 соответствуют разупорядоченным остаткам/участкам. Для получения наиболее значимого консенсусного предсказания применение нескольких алгоритмов целесообразно ввиду ряда особенностей каждого из них. *PONDR® VSL2B* считается одним из наиболее точных независимых предсказателей ID [432]; *PONDR® VL3* обладает высокой точностью при поиске длинных разупорядоченных областей [433]; *PONDR® VLXT* не является самым точным предсказателем, но обладает высокой чувствительностью к особенностям локальной последовательности, которые часто связаны с участками взаимодействий, основанных на ID [160]; *PONDR-FIT* представляет собой метапредикатор, который считается более надежным, чем каждый из отдельно взятых алгоритмов [434]. Преимущество *IUPred* [435] состоит в том, что основан на физическом принципе, согласно которому глобулярные белки имеют большее количество эффективных взаимодействий (отрицательных свободных энергий взаимодействий) между остатками, чем белки с выраженной ID.

Кроме того, склонность различной длины N-концевых последовательностей 14-3-3 к ID в целом была оценена с помощью бинарного предсказателя, основанного на построении параметрических графиков заряда-гидрофобности (CH) [15, 437]. График CH представляет усредненную гидрофобность (ось X) и усредненный суммарный заряд (ось Y) белка или его фрагмента. Накопленный эмпирический опыт о том, какими зарядом и гидрофобностью

обладают структурированные и разупорядоченные белки, позволяет провести пограничную линию, которая разделяет график СН на верхнюю левую область, где обычно расположены неупорядоченные белки, и нижнюю правую область, где обычно располагаются структурированные белки [15, 437]. Тогда анализ заряда и гидрофобности исследуемой последовательности позволяет нанести на СН-график соответствующую ей точку и, по ее расположению относительно границы, сделать вывод о склонности белка к ID. Чем дальше от границы находится точка, тем более надежным считается предсказание на основе СН-графика.

2.2.16. Другие аналитические методы

2.2.16.1. Спектрофотометрическое определение концентрации белка

Оптическую плотность растворов белка измеряли на спектрофотометре Implen P330 nanophotometer (Германия). При расчете концентрации использовали весовые и молярные коэффициенты экстинкции при 280 нм, рассчитанные по последовательности белка с помощью инструмента *ProtParam* в *ExPasy* (<https://web.expasy.org/protparam/>).

2.2.16.2. ДСН-электрофорез по методу Лэммли

Для анализа белкового состава различных проб использовали ДСН-электрофорез (метод Лэммли), который проводили в 15% разделяющем полиакриламидном геле (состав приведен в Табл. 18) [360]. Полимеризацию индуцировали добавлением ПСА и ТЕМЕД до конечной концентрации 0,1%. Для построения калибровочного графика и определения молекулярных масс исследуемых белков использовали наборы белков-маркеров с известными молекулярными массами.

Пробы для ДСН-электрофореза готовили следующим образом: к белковому раствору добавляли ¼ объема 4-х кратного буфера для образцов, содержащего 0,25 М Трис-НСl, рН 6,8, 8% ДСН, 40% глицерин, 0,004% бромфеноловый синий, 5% МЭ. Пробы прогревали при 95 °С в течение 5 мин. На дорожку наносили 1-10 мкг белка. В качестве анодного буфера использовали 0,25 М Трис-НСl с рН 8,6. Катодный буфер содержал 0,192 М глицин-Трис с рН 8,6 и 0,1% ДСН. Электрофорез проводили в течение 60-70 мин при силе тока 10 мА на

пластину геля до входа красителя в разделяющий гель и 20 мА на пластину после входа красителя в разделяющий гель.

По окончании электрофореза гель переносили в 10% уксусную кислоту на 10 мин для фиксации белков и отмывки геля от ДСН. После фиксации гели окрашивали раствором Кумасси R-250 (0,3% Кумасси синий R-250, 20% изопропанол, 10% уксусная кислота) в течение получаса на шейкере. Избыток красителя отмывали на кипящей водяной бане в дистиллированной воде. Полученные гели высушивали, сканировали, и проводили количественную денситометрию интересных полос в программе *ImageJ*.

Табл. 18. Состав растворов для полимеризации 1 пластины ПААГ для ДСН-электрофореза по методу Лэммли.

Компоненты, мл	Разделяющий гель, 15%	Концентрирующий гель, 6%
30% АА на 0,8% МБА	1,9	0,3
Буфер для разделяющего геля (1,5 М Трис-НСl, рН 8,8, 0,4% ДСН)	0,94	—
Буфер для концентрирующего геля (0,5 М Трис-НСl, рН 6,8, 0,4% ДСН)	—	0,38
H ₂ O	1	0,83

2.2.16.3. Градиентный ДСН-электрофорез

Для лучшего разрешения полос белков, сильно различающихся по молекулярным массам, использовали метод ДСН-электрофореза с градиентом концентрации акриламида в разделяющем геле от 5 до 20% или от 12 до 20% [438]. Разделяющий гель готовили вручную с помощью градиентатора. Полимеризацию гелей индуцировали добавлением ПСА и ТЕМЕД в сосуды градиентатора. Состав растворов, необходимых для приготовления 5-20% градиентного геля, в качестве примера приведен в Табл. 19.

Пробы для градиентного ДСН-электрофореза готовили аналогично тому, как описано для метода Лэммли. Электрофорез проводили в камерах Hoefer SE300 при 300 В и 10-20 мА на 1 пластину геля в течение ~100 мин. Краситель «выходил» из геля уже через 40-50 мин после начала электрофореза. По окончании электрофореза гели обрабатывали так же, как описано для метода Лэммли.

Табл. 19. Состав растворов для полимеризации 1 пластины ПААГ для 5-20% градиентного ДСН-электрофореза.

Компоненты	Разделяющий гель		Концентрирующий гель, 4%
	5%	20%	
30% АА на 0,8% МБА, мл	0,58	2,33	0,27
Буфер для разделяющего геля (1,5 М Трис-НСl, рН 8,8, 0,4% ДСН), мл	0,87	0,87	—
Буфер для концентрирующего геля (0,5 М Трис-НСl, рН 6,8, 0,4% ДСН), мл	—	—	0,5
H ₂ O, мл	2,05	0,3	1,23
ТЕМЕД, мкл	3	3	3
10% р-р ПСА, мкл	15	12	20

2.2.16.4. Изоэлектрофокусирование

Образцы белка подвергали изоэлектрическому фокусированию в 5% полиакриламидных гелях, содержащих 8,5 М мочевины, 0,02% Тритона X-100 и 0,4% амфолинов (рН 3-10) и 1,6% амфолинов (рН 5-7). В качестве электродных буферов использовали 10 мМ H₃PO₄ и 20 мМ NaOH. После электрофокусировки (3 часа при 500 В) гели фиксировали в растворе, содержащем 4% сульфосалициловой кислоты, 12% трихлоруксусной кислоты и 30% этанола, промывали в растворе, содержащем 10% уксусной кислоты и 30% растворе этанола, и окрашивали Кумасси R-250. Значения изоэлектрической точки оценивали, сравнивая с положением белков с известной изоэлектрической точкой.

2.2.16.5. Электрофорез белков в нативных условиях

Электрофорез в неденатурирующих условиях по методу, разработанному Шаубом и Пэрри [439], проводили в 15% полиакриламидном геле, содержащем 15% глицерин (состав геля приведен в Табл. 20). В таких условиях электрофоретическая подвижность белков зависит не только от их молекулярной массы, но также от формы и заряда, что удобно использовать для идентификации фосфорилирования и дефосфорилирования очищенного белка, а также для исследования взаимодействия между белками.

Полимеризацию гелей индуцировали добавлением ПСА и ТЕМЕД до конечной концентрации 0,1%. Перед нанесением образцов на гель к белковому раствору добавляли 1/4-1/3 объема буфера для образцов (40 мМ глицин-Трис, рН 8,6, 25% глицерин, 0,004% бромфеноловый синий, 4% МЭ). На дорожку наносили от 1 до 7 мкг белка. В качестве электродного буфера использовали 0,08 М глицин-Трис, рН 8,6. Электрофорез проводили при силе тока 15 мА на пластину и напряжении 300 В. Фронт красителя бромфенолового синего проходил всю длину геля за 30-40 мин с момента начала электрофореза, эксперимент продолжали еще 20-30 мин. По окончании электрофореза проводили фиксацию и окрашивание с помощью Кумасси R-250. Где было необходимо, денситометрию белковых полос проводили в программе *ImageJ* после вычитания фонового окрашивания.

Табл. 20. Состав растворов для полимеризации 1 пластины 15% ПААГ для нативного электрофореза в гомогенной системе Шауба-Перри.

Компоненты	Объем, мл
0,8 М Глицин-Трис, рН 8,6	0,54
30% АА на 0,8% МБА	2,7
H ₂ O	1,36
Глицерин 99,9%	0,8

2.2.16.6. Авторадиография

Полиакриламидные гели высушивали между двумя слоями целлофановой пленки и при свете красной лампы закладывали между двумя слоями фотографической пленки Hyperfilm MP в кассету для авторадиографии Hypercassette (Amersham Lifescience). Время экспозиции составляло от 20 часов. После экспозиции пленку проявляли и фиксировали с использованием проявляющего раствора (0,22% метол, 7,2% сульфит натрия, 0,88% гидрохинон, 4,8% углекислый натрий, 0,4% бромистый калий) и фиксирующего раствора (26% тиосульфат натрия, 5% хлористый аммоний) [440].

2.2.16.7. Масс-спектрометрия

Масс-спектрометрический анализ проводили в ЦКП «Промышленные Биотехнологии» ФИЦ Биотехнологии РАН (группа MALDI,

<https://www.fbras.ru/services/ckp/ckp-promyshlennye-biotexnologii>) на приборе MALDI TOF/TOF ultrafleXtreme (Bruker, Германия).

Для того чтобы идентифицировать участки фосфорилирования, проводили трипсинолиз в геле с использованием протеазы высочайшей степени чистоты, обессоливание образцов и дальнейший анализ полученных триптических фрагментов, нанося на подложки MALDI. Продукты ограниченного протеолиза *in vitro* анализировали, непосредственно используя аликвоту реакционной смеси после обессоливания. Спектры определяли и анализировали в программном обеспечении *flexAnalysis 3.3* (Bruker, Германия), а сопоставление полученных масс с ожидаемыми значениями для различных фрагментов целевых белков – с помощью программы *massXpert* [383].

Автор благодарен вед.специалисту М.В. Серебряковой, м.н.с. И.А. Каменихиной, м.н.с. Л.А. Новиковой и м.н.с. Т.Ю. Исайкиной за помощь в проведении масс-спектрометрического анализа.

2.2.16.8. Некоторые биоинформатические методы

Множественное выравнивание последовательностей проводили с помощью *T-Coffee* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>) [441] или *ClustalOmega* [98] и набора параметров по умолчанию. Консенсусные мотивы, отражающие представленность того или иного остатка в данном положении в последовательности, строили с помощью *Weblogo* [442]. Картирование поверхности белка на основе эволюционной консервативности строили с помощью *Consurf* [121] на основе множественного выравнивания, выполненного в *ClustalOmega* [98], и наиболее репрезентативной кристаллической структуры. Все структурные модели построены с помощью *PyMOL 2.20* (Schrödinger, Inc.) на основе кристаллографических данных, опубликованных в PDB (коды соответствующих структур указаны). Картирование поверхности белка на основе различий в значении электростатического потенциала производилось в *PyMOL* с использованием плагина *APBS* [443]. Расчет параметров молекулярных интерфейсов был произведен с помощью *PISA* [444].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Молекулярный механизм взаимодействия 14-3-3 с малым белком теплового шока HSPB6

3.1.1. Олигомерное состояние белков 14-3-3 и HSPB6

Важным свойством белков является их способность образовывать олигомерные комплексы различного состава, при этом предрасположенность к гомоолигомеризации может интерферировать с возможностью образовывать комплексы с другими белками. В этой связи, перед началом исследования механизма взаимодействия белков 14-3-3 и HSPB6 было целесообразно изучить олигомерное состояние этих белков.

Как было отмечено, белки 14-3-3 кристаллизуются в виде α -спиральных димеров вне зависимости от того, полипептидными цепями каких изоформ они образованы, причем оба мономера 14-3-3 несут по одной амфипатической бороздке (АБ) для связывания фосфопептидов и образуют обширный интерфейс [71, 72, 113, 114, 445]. Как правило, С-концевой пептид не виден в картах электронной плотности ввиду разупорядоченности. Мы проанализировали конформацию полноразмерного белка 14-3-3 и его варианта лишённого С-концевого пептида в растворе (Рис. 22 и Рис. 23). По данным малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (МУРР), олигомерное состояние белков 14-3-3 остается постоянным в широком диапазоне концентраций белка (от 1 до 9 мг/мл) (Рис. 22). Их конформация в растворе может быть хорошо описана кристаллической структурой с достройкой гибких С-концевых пептидов в виде ансамбля конформаций (Рис. 23А и Б) с помощью *Ensemble Optimization Method (EOM)* [428]. Важно, что удаление С-концевых пептидов практически не влияет на конформацию «ядра» димеров (Рис. 23В и Г), что может быть полезно для структурных исследований. Наличие С-концевых пептидов, наоборот, значительно увеличивает размер молекул димеров (R_g для полноразмерного и усеченного вариантов равны 3.0 и 2.8 нм, соответственно, см. Рис. 23) и, ввиду их гибкости, создает некоторый пуф вокруг α -спирального ядра, который может мешать кристаллизации и связыванию с белками-партнерами.

Как отмечалось выше, ранее было показано, что белки 14-3-3 являются партнерами малого белка теплового шока HSPB6, причем прямое взаимодействие этих белков зависит от фосфорилирования HSPB6 по остатку Ser16 (RRAS¹⁶APLP) под действием протеинкиназ PKA и PKG при расслаблении гладкой мускулатуры [132, 250, 323, 325, 326, 331, 344, 446, 447]. В наших условиях остаток Ser16 единственный, который фосфорилируется в HSPB6 человека под действием PKA (Рис. 24).

Несмотря на то, что в разбавленном растворе белок HSPB6 представлен преимущественно димерами [132, 308, 313], малым белкам теплового шока свойственна выраженная склонность к образованию различных олигомеров высокого порядка [448-451].

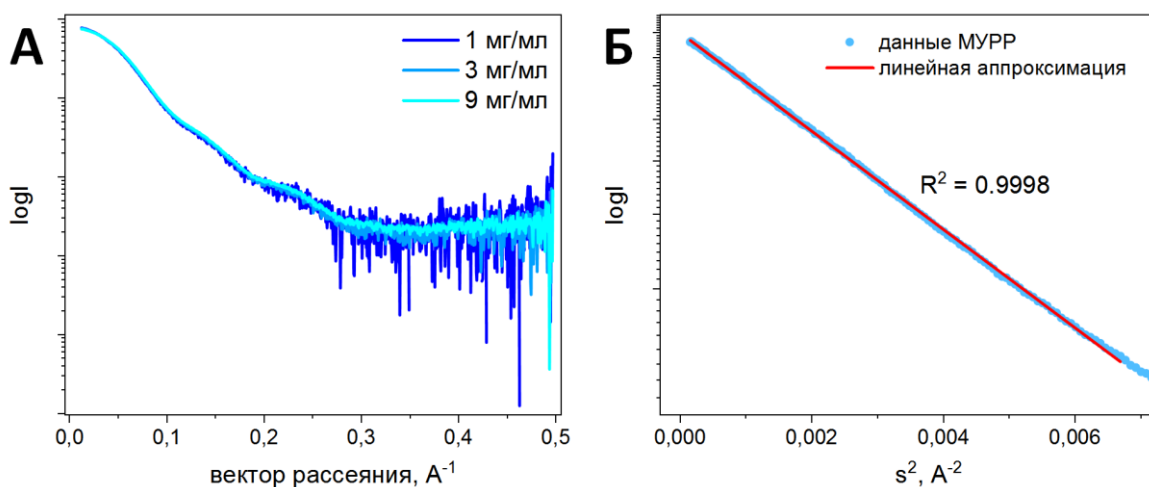


Рис. 22. 14-3-3 образует димеры в широком диапазоне концентраций белка. А. МУРР для 14-3-3 ζ ΔС при 1, 3 и 9 мг/мл дает одинаковые по форме кривые. Б. Полученные данные МУРР имеют идеальную линейность в диапазоне Гинье, что показывает отсутствие склонности к агрегации или расталкиванию частиц даже при сильном увеличении концентрации.

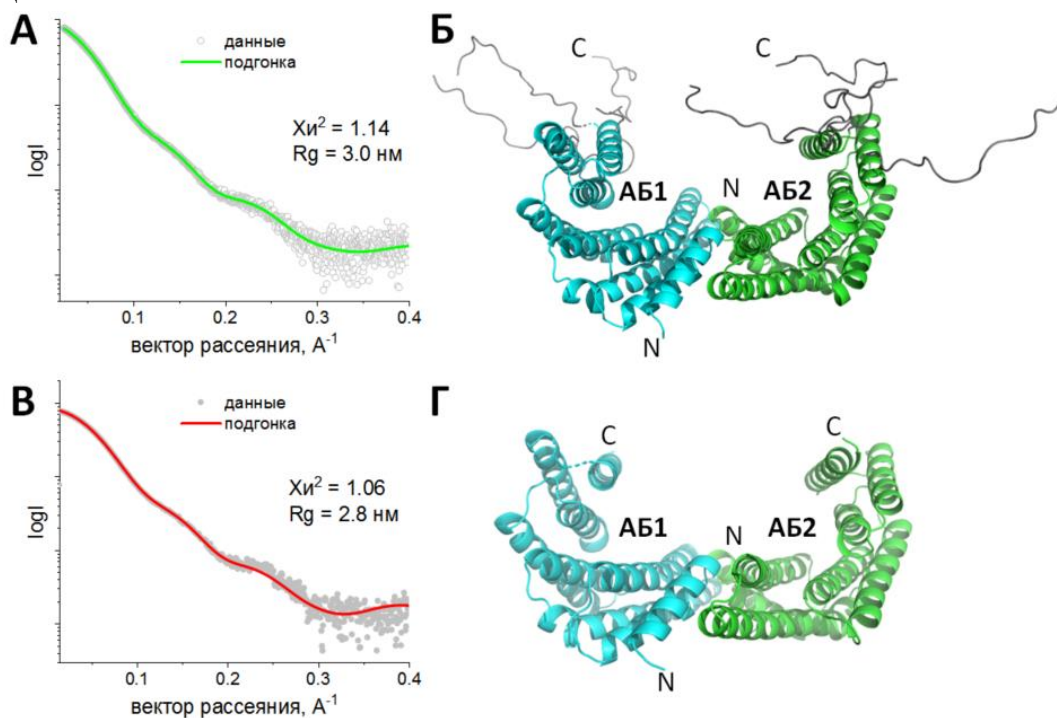


Рис. 23. Конформация димеров 14-3-3 ζ в растворе. Результат фитирования экспериментальных данных МУРР для полноразмерного белка 14-3-3 ζ (остатки 1-245) (А) с помощью моделей с различным положением С-концевого пептида, рассчитанных с помощью метода *EOM* [428] (Б). Результат фитирования данных МУРР для 14-3-3 ζ , укороченного с С конца (14-3-3 ζ ΔС, остатки 1-229) (В) с помощью кристаллографической модели (код PDB 4N7Y) (Г). Показано качество подгонки (χ^2) и экспериментальное значение R_g . АБ1 и АБ2 – амфипатические бороздки для связывания фосфопептидов.

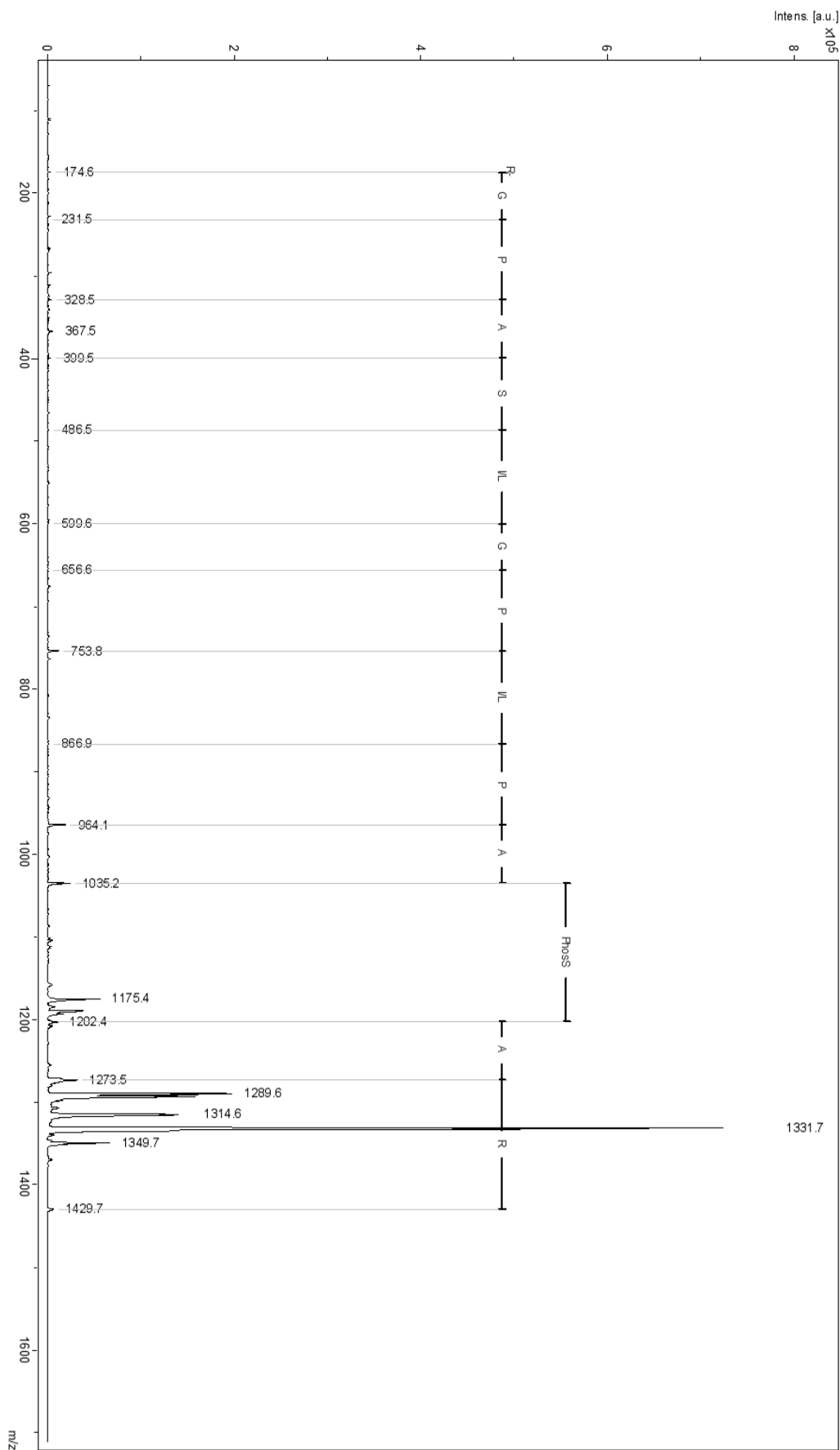


Рис. 24. MS/MS спектр фосфопептида с массой 1429,7 Да, соответствующего последовательности RApS¹⁶APLPGLSAPGR белка HSPB6.

Наиболее распространенным и хорошо изученным представителем малых белков теплового шока является белок α В-кристаллин (или HSPB5), который образует полидисперсные олигомеры от 10 до 40 субъединиц в зависимости от условий [315, 452, 453]. Прежде чем перейти к исследованию олигомерного состояния HSPB6, мы остановились на исследовании олигомерного состояния HSPB5 методом аналитического ультрацентрифугирования (АУЦ).

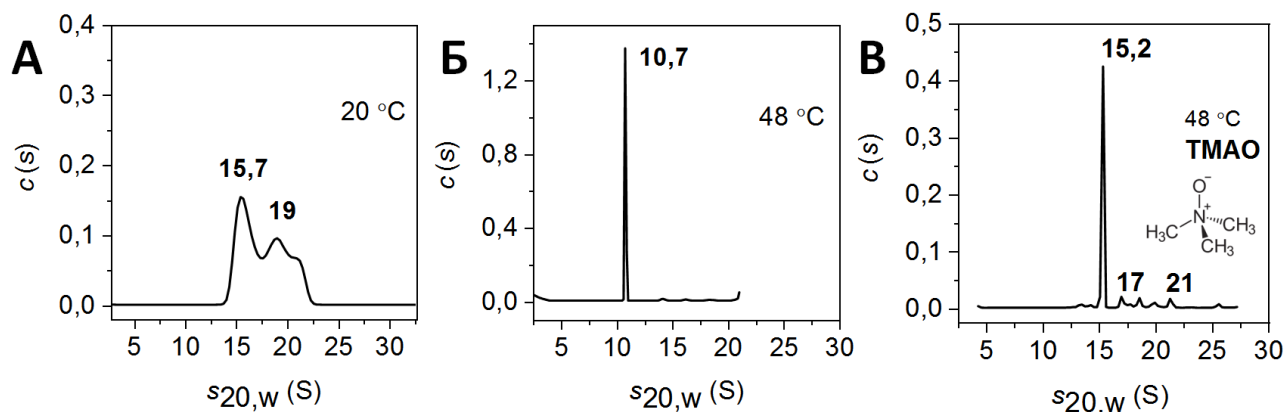


Рис. 25. Седиментация HSPB5 в разных условиях – при температуре 20 °C (А), 48 °C (Б) или 48 °C в присутствии 1 М триметиламин N-оксида (ТМАО) (В). На панели В представлена структурная формула ТМАО.

По данным АУЦ, при 20 °C и концентрации 0,3 мг/мл HSPB5 образует крупные частицы в диапазоне коэффициентов седиментации 14-23 S (Рис. 25А). При этом их средний коэффициент седиментации составляет 18 S, средний радиус Стокса 10,8 нм и масса 735 ± 82 кДа, что, с учетом массы субъединицы 20 кДа, ориентировочно соответствует 36-мерам HSPB5 (Табл. 21). Наличие нескольких пиков на распределении говорит о динамичности структуры HSPB5 и сосуществовании нескольких крупных олигомерных форм.

Табл. 21. Зависимость размера HSPB5 от температуры. Значения коэффициента седиментации и молекулярной массы получены при анализе данных АУЦ в программе *SEDFIT* [377], значения радиуса получены при анализе данных ДСР в программе *DynaLS* [454].

Температура	20 °C	48 °C
Коэффициент седиментации ($s_{20,w}$), S	$18,0 \pm 2,0$	$10,7 \pm 0,2$
Гидродинамический радиус (R_h), нм	$10,8 \pm 0,4$	$8,8 \pm 0,4$
Молекулярная масса, кДа	735 ± 82	481 ± 44

Повышение температуры при тепловом шоке приводит к уменьшению полидисперсности и размера олигомеров HSPB5 до его ~22-меров (Рис. 25Б и Табл. 21). В то

же время, добавление краудинг-агентов, таких как триметиламин N-оксид (ТМАО), приводящих к исключению объема, вновь вызывает увеличение размера частиц HSPB5 при повышенной температуре до ~28-меров (Рис. 25 и Табл. 21). Таким образом, олигомерная структура HSPB5 крайне динамична, что является общим свойством и для ряда других малых белков теплового шока и, по всей видимости, необходимо для выполнения антиагрегационной функции этих белков [455-460].

Олигомерное состояние HSPB6 (далее для удобства просто «В6») было исследовано с помощью комбинации методов. При проведении гель-фильтрации в диапазоне концентраций от 0,5 до 2,5 мг/мл В6 дает один симметричный пик с кажущейся молекулярной массой около 50 кДа, причем профиль элюции практически не зависит от фосфорилирования В6 по остатку Ser16 или фосфоимитирующей мутации S16D (Рис. 26А). Несколько увеличенный размер по сравнению с ожидаемым для димера В6 (рассчитанная по аминокислотной последовательности масса мономера равна 17,1 кДа) описан и в других работах и, по-видимому, связан с гидродинамическими свойствами этого белка, состоящего из центрального α -кристаллинового домена и большого количества структурно-разупорядоченных N- и C-концевых сегментов [132, 308, 313] (см. Рис. 16Б).

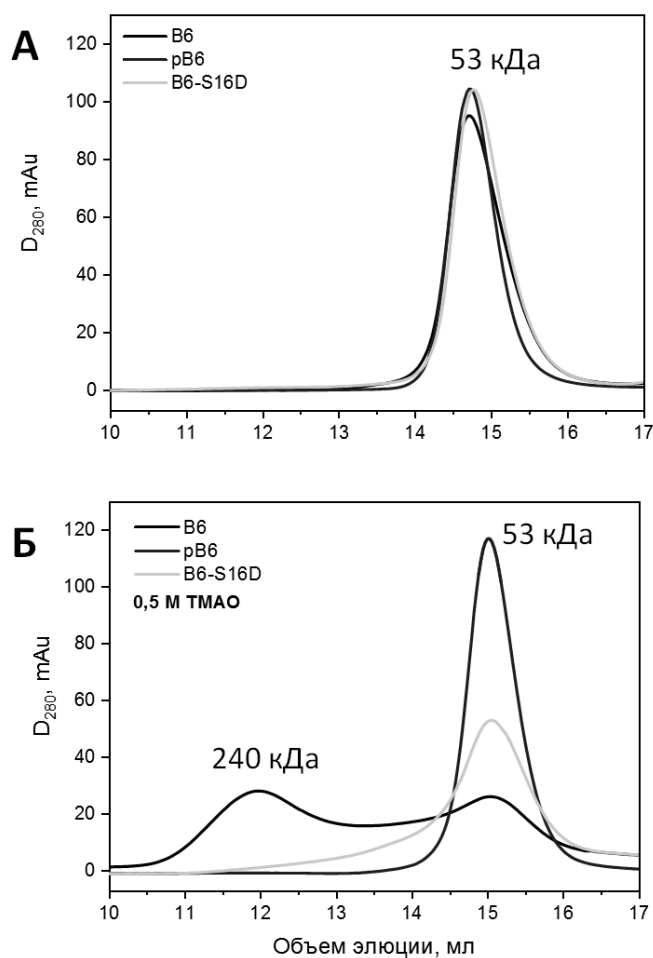


Рис. 26. Гель-фильтрация нефосфорилированного, фосфорилированного и псевдофосфорилированного (S16D) белка В6 (2,5 мг/мл) на колонке Superdex 200 10/300 (GE Healthcare). Хроматографию выполняли либо в отсутствие (А), либо в присутствии (Б) 0,5 М ТМАО в образце и в колоночном буфере. Кажущиеся молекулярные массы, определенные из калибровки колонки, указаны над каждым пиком. Олигомерные формы в присутствии ТМАО (240 кДа) много меньше, чем предел исключения для взятой колонки (600 кДа), поэтому не являются агрегатами В6.

Значительные изменения на профилях ГФ наблюдаются при наличии 0,5 М ТМАО в буфере для образцов и в колоночном буфере (Рис. 26Б). На профиле элюции нефосфорилированного В6 наблюдаются два пика с объемами элюции ~ 11,9 и ~ 14,9 мл, соответствующие молекулярным массам ~ 240 и 53 кДа и радиусам Стокса 53,2 и 30,3 Å, соответственно (Рис. 26Б). Эти два пика не полностью разделены и связаны протяженным плато, что указывает на присутствие равновесной полидисперсной смеси малых и более крупных олигомеров. В то же время в случае фосфорилированного или псевдофосфорилированного В6 профиль элюции содержит только один основной пик с кажущейся молекулярной массой ~ 53 кДа (Рис. 26Б). В случае псевдофосфорилированного мутанта S16D наблюдалась асимметрия пика с подъемом базовой линии в области, где наблюдалось плато для нефосфорилированного белка. Качественно аналогичные результаты были получены при использовании колонки ProSEC300S (не показано), однако в этом случае интерпретация результатов была несколько затруднена неспецифическим взаимодействием нефосфорилированного В6 с хроматографической матрицей. В любом случае, хроматографические данные показывают, что добавление ТМАО индуцирует образование различных олигомеров В6, а фосфорилирование (или точечная мутация, имитирующая фосфорилирование) предотвращает ТМАО-индуцированную олигомеризацию В6.

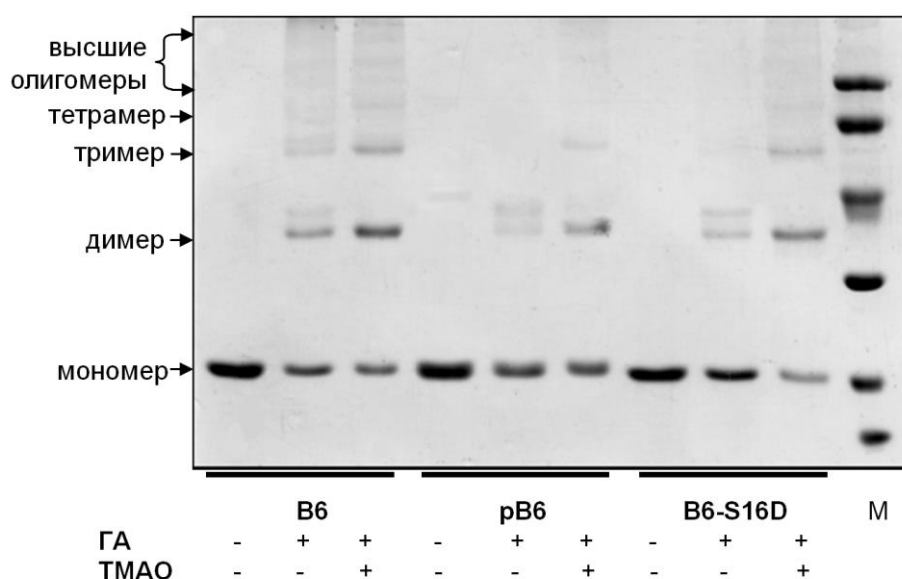


Рис. 27. Влияние ТМАО на химическое «сшивание» нефосфорилированного (В6), фосфорилированного (pB6) и псевдофосфорилированного (В6-S16D) белков глутаральдегидом (ГА). Образцы В6 (0,7 мг/мл) инкубировали в течение 30 мин при 37 °С в присутствии (+) или в отсутствие (-) 0,5 М ТМАО без (-) или с (+) 0,027% ГА, а затем анализировали с помощью ДСН-электрофореза. Белковые стандарты с кажущимися молекулярными массами 94, 68, 43, 30, 20 и 14 кДа нанесены на дорожку «М». Позиции мономеров и «сшитых» олигомеров В6 отмечены стрелками.

Химическое «сшивание» использовали для дальнейшего исследования олигомерного состояния В6. Сшивание нефосфорилированного В6 глутаральдегидом (ГА) приводило к накоплению дополнительных белковых полос с кажущейся молекулярной массой 41 и 65 кДа, что соответствовало сшитым димерам и тримерам В6 (Рис. 27). Добавление ТМАО к инкубационным смесям увеличило вероятность сшивания В6, и в дополнение к полосам с кажущейся молекулярной массой 41 и 65 кДа, которые в этом случае были более интенсивными, мы обнаружили новые полосы с молекулярной массой, соответствующей крупным сшитым олигомерам В6 (Рис. 27). Сшивание фосфорилированного В6 было значительно менее эффективным, чем сшивание нефосфорилированного белка, и на геле были обнаружены только две слабые полосы с кажущейся молекулярной массой 41 и 45 кДа, предположительно соответствующие различным образом сшитым димерам В6 (Рис. 27). Добавление ТМАО несколько увеличивало вероятность сшивания фосфорилированного В6, однако даже в присутствии 0,5 М ТМАО сшивание фосфорилированного В6 приводило только к накоплению слабой полосы димера с кажущейся молекулярной массой 41 кДа (Рис. 27). Менее выраженные, но качественно сходные результаты были получены с фосфоимитирующим мутантом S16D (Рис. 27), что позволяет предположить, что мутация S16D не полностью имитирует эффект фосфорилирования. Таким образом, данные экспериментов по сшиванию подтверждают данные, полученные с помощью ГФ, и вместе показывают, что ТМАО индуцирует олигомеризацию В6, тогда как фосфорилирование противодействует этому эффекту.

Чтобы лучше понять влияние ТМАО и фосфорилирования на олигомерные и гидродинамические свойства В6, мы подвергли нефосфорилированный, фосфорилированный и псевдофосфорилированный (S16D) В6 седиментационному анализу. Предварительно мы проанализировали эти образцы с помощью электрофореза в неденатурирующих условиях. Все образцы были гомогенными в соответствии с ДСН- (данные не представлены) и нативным электрофорезом (вставка на Рис. 28А). Как и следовало ожидать из относительных зарядов белков, в нативных условиях нефосфорилированный В6 обладал самой низкой электрофоретической подвижностью, за которой следовал мутант S16D, а затем наиболее подвижный фосфорилированный В6 (вставка на Рис. 28А).

В использованных условиях распределения $s(s)$ для нефосфорилированного или фосфорилированного В6, а также для мутанта S16D показали более или менее симметричные пики со средними коэффициентами седиментации 2,8-2,9 S (Рис. 28А). Только очень небольшая часть (значительно менее 10%) белка седиментировала с более высокими

коэффициентами седиментации (4,1-4,7 S) (Рис. 28А-В). Используя метод *SEDFIT* и расширение *Fujita* для *SEDFIT* [380], позволяющее рассчитать распределения $c(M)$, мы оценили молекулярную массу нефосфорилированного, фосфорилированного и псевдофосфорилированного В6, равные $37,8 \pm 1,5$ кДа, $34,0 \pm 1,3$ кДа и $35,9 \pm 2,8$ кДа, соответственно. Пример такого распределения для фосфорилированного В6 показан в виде вставки на Рис. 28В. Эти значения очень близки к расчетной молекулярной массе димера В6, равной 34,272 кДа. Почти такие же значения были получены при вдвое более высокой концентрации В6 (не показано). Максимальный коэффициент седиментации для сферического белка с молекулярной массой 34 кДа равен 3,82 S [461], и поэтому фрикционное соотношение $f/f_{\min} = S_{\max}/S = 1,34$, указывает на то, что в используемых условиях димерный В6 ведет себя как глобулярный белок с формой, слегка сжатой с полюсов.

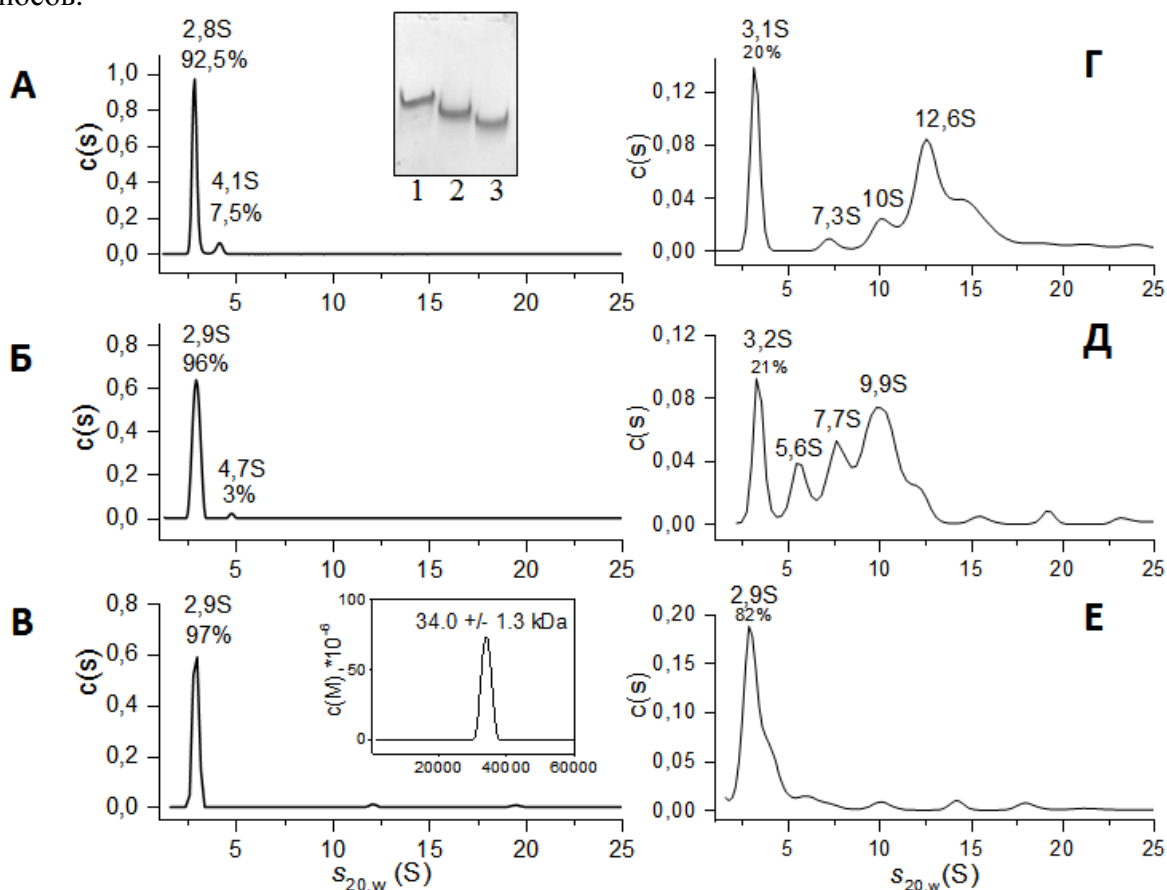


Рис. 28. Седиментация нефосфорилированного В6 (А,Г), псевдофосфорилированного мутанта S16D (Б,Д) и фосфорилированного В6 (В,Е) в отсутствие (А,Б,В), либо в присутствии (Г,Д,Е) 1 М ТМАО при 20°C и скорости вращения ротора 52000 об/мин. Концентрация белка 0,3 мг/мл. Вставка на панели А показывает электрофореграмму В6 (1), S16D (2) и pB6 (3) в нативных условиях. Вставка на панели В показывает распределение $c(M)$ для pB6 в отсутствие ТМАО. Коэффициенты седиментации и доля соответствующих видов частиц указаны над соответствующими пиками.

В присутствии 1 М ТМАО было выявлено несколько пиков распределения $s(s)$ для нефосфорилированного В6 (Рис. 28Г). В этом случае мы обнаружили не менее четырех пиков с коэффициентами седиментации 3,1, 7,3, 10,0 и 12,6 S, и большая часть белка (~ 80%) была представлена пиками с высокими значениями коэффициентов седиментации (~ 7-13 S), что свидетельствовало о выраженной самоассоциации белка. Добавление 1 М ТМАО к фосфорилированному В6 лишь незначительно сказалось на его поведении при седиментации, и в этом случае коэффициенты седиментации в присутствии или в отсутствие 1 М ТМАО были сходными (~ 2,9 S), а добавление ТМАО привело к появлению только незначительных пиков с более высокими коэффициентами седиментации (Рис. 28Е). Это указывает на то, что образование крупных олигомеров в случае фосфорилированного В6 значительно затруднено. Добавление 1 М ТМАО к псевдофосфорилированному В6 (мутант S16D) приводило к промежуточному поведению этого белка между таковым у нефосфорилированного и фосфорилированного В6. В этом случае добавление ТМАО также сопровождалось появлением новых пиков с высокими коэффициентами седиментации (Рис. 28Д), однако коэффициенты седиментации олигомеров в этом случае были значительно меньше, чем в случае нефосфорилированного В6 (Рис. 28Г).

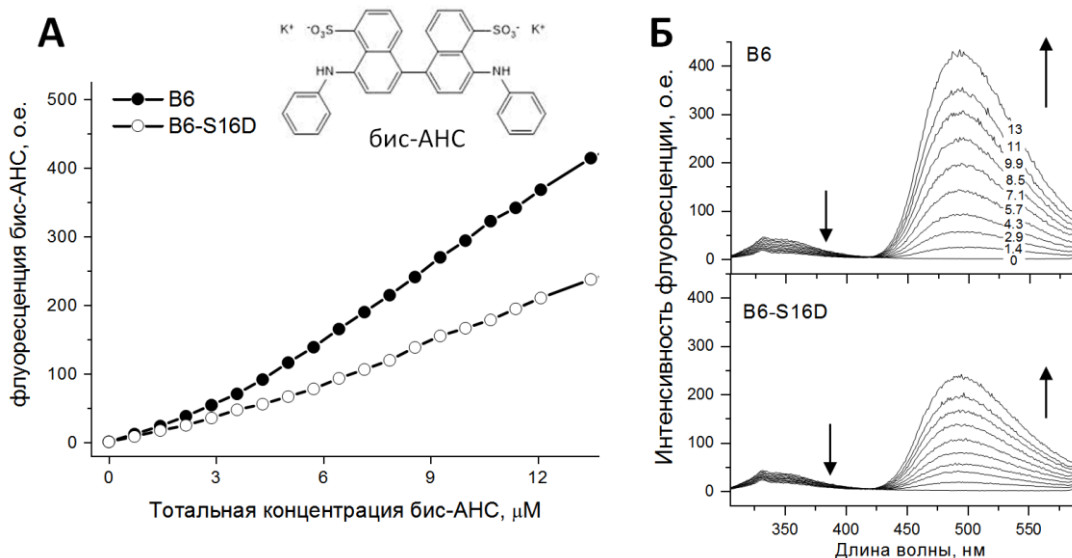


Рис. 29. Гидрофобные свойства В6 и его мутанта В6-S16D, по данным взаимодействия с флуоресцентным зондом бис-АНС. Образцы белка (1,6 мкМ на мономер) инкубировали 15 мин при 37 °С и затем титровали раствором бис-АНС (диапазон конечных концентраций 0-13 мкМ). После каждого добавления бис-АНС регистрировали интенсивность флуоресценции бис-АНС при 495 нм (возбуждение при 385 нм), получая кривые титрования (А). На вставке приведена структурная формула бис-АНС. Дополнительно в ходе титрования регистрировали спектры эмиссии в диапазоне от 305 до 590 нм при возбуждении на 297 нм (Б). Стрелками показаны спектральные изменения, на верхнем графике приведены значения конечных концентраций бис-АНС (в мкМ) в ходе титрования. Эксперименты проводили на спектрофлуориметре CaryEclipse (Varian).

Полученные данные указывали на то, что фосфоимитирующая мутация или фосфорилирование уменьшают или полностью предотвращают ТМАО-индуцированную олигомеризацию В6. Мы предположили, что это может быть связано с различием в гидрофобных свойствах нефосфорилированных и фосфорилированных форм белка. Чтобы проверить эту гипотезу, мы проанализировали влияние фосфоимитирующей мутации на гидрофобные свойства В6 по способности связывать флуоресцентный зонд бис-АНС. Титрование нефосфорилированного В6 бис-АНС сопровождалось постепенным увеличением флуоресценции бис-АНС, что указывало на взаимодействие гидрофобного флуоресцентного зонда с В6 (Рис. 29). Интенсивность флуоресценции увеличивалась практически линейно в зависимости от концентрации добавленного бис-АНС, и даже при высокой концентрации бис-АНС нам не удалось достичь насыщения (Рис. 29А). Эти результаты могут указывать на то, что нефосфорилированный В6 содержит большое количество низкоаффинных сайтов связывания бис-АНС [217]. Титрование фосфоимитирующего мутанта (S16D) бис-АНС также сопровождалось линейным увеличением флуоресценции, однако амплитуда пика флуоресценции бис-АНС была в 1,5-2,0 раза ниже, чем в случае нефосфорилированного В6 дикого типа (Рис. 29А и Б). Это подтверждает идею о том, что фосфоимитирующая мутация (и фосфорилирование) снижает гидрофобность В6.

Полученные нами результаты означают, что димеры В6, доминирующие в разбавленных растворах, проявляют значительную склонность к самоассоциации в условиях краудинга, а фосфорилирование Ser16 эффективно препятствует этому (Рис. 30), предрасполагая фосфорилированные димеры белка В6 к взаимодействию с димерами 14-3-3.

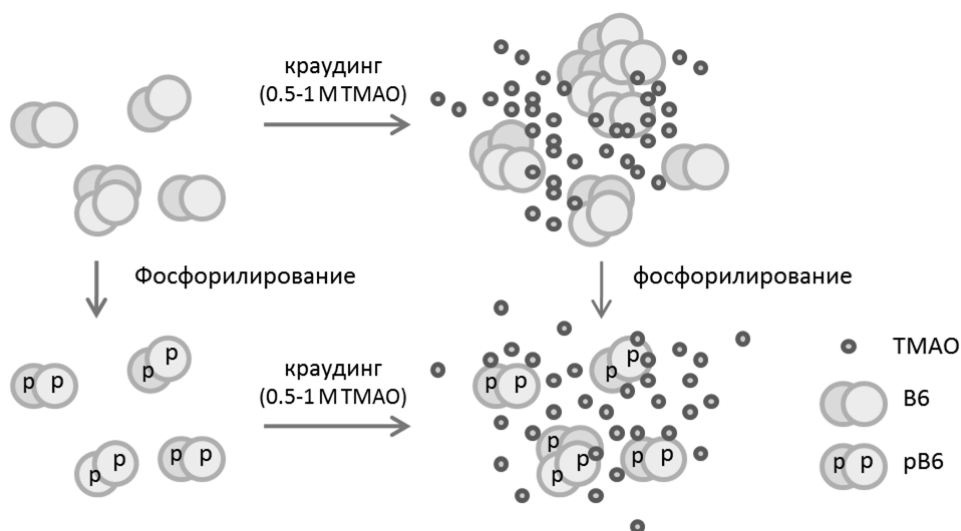


Рис. 30. Схема, иллюстрирующая влияние фосфорилирования на самоассоциацию белка В6 в условиях краудинга, имитируемого добавлением ТМАО.

3.1.2. Эффект фосфата на взаимодействие белков 14-3-3 и HSPB6

Ранее было показано, что только фосфорилированная форма белка В6 («рВ6») взаимодействует с 14-3-3 ζ [132], и что 14-3-3 способны связывать только фосфорилированные формы пептидных фрагментов В6 [250]. В то же время полностью эквивалентные нефосфорилированные последовательности не связываются с 14-3-3 [132, 250]. Это означает, что остаток фосфата играет ключевую роль в распознавании рВ6 белками 14-3-3, и позволяет предположить, что наличие низкомолекулярных фосфатов и других анионов, присутствующих в клетке в миллимолярных концентрациях [462, 463], может влиять на это взаимодействие.

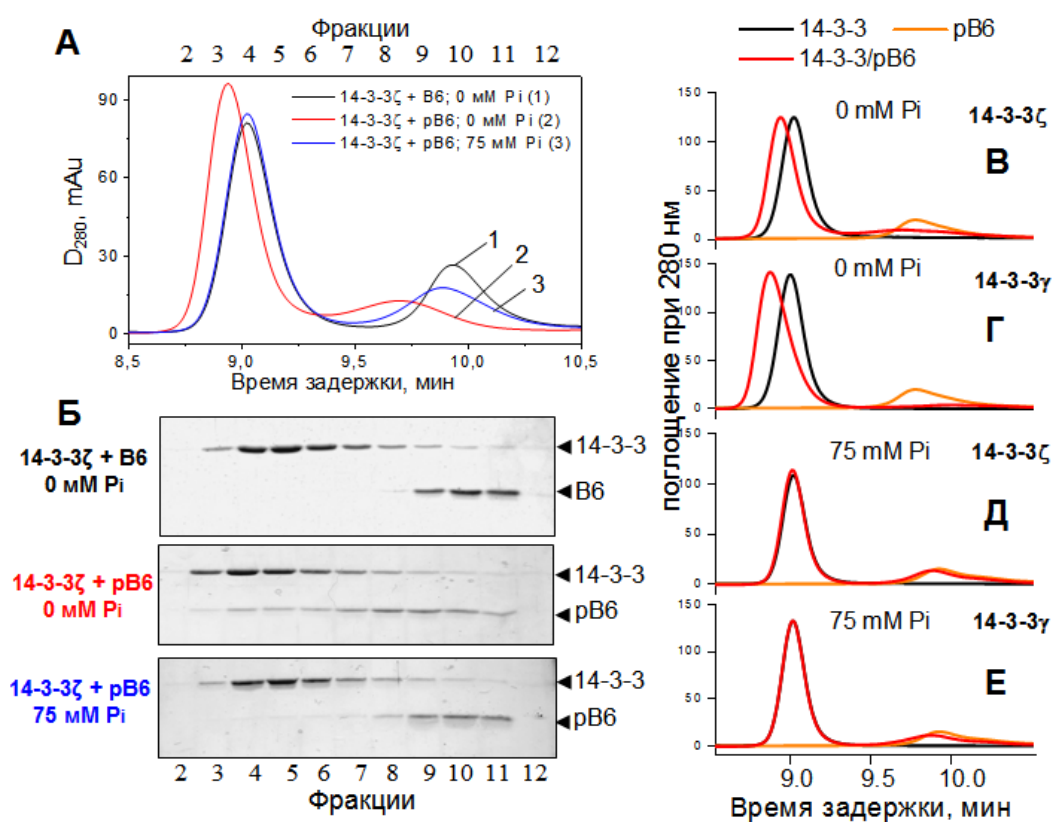


Рис. 31. Эффект фосфорилирования белка В6 и 75 мМ неорганического фосфата (Pi) на взаимодействие В6 и 14-3-3, по данным ГФ (А) с последующим анализом фракций методом ДСН-электрофореза (Б). На колонку наносили смесь 14-3-3 ζ с нефосфорилированным В6 (1), фосфорилированным В6 в отсутствие (2) или в присутствии фосфата (3). Положения белков на гелях указаны стрелками. Взаимодействие рВ6 с 14-3-3 ζ (В,Д) и 14-3-3 γ (Г,Е) в среде без (В,Г) или с 75 мМ фосфатом (Д,Е).

Мы решили проверить эту гипотезу, исследовав влияние неорганического фосфата (Pi) на взаимодействие 14-3-3 с В6. Ранее было показано, что гель-фильтрация (ГФ) является

удобным методом исследования взаимодействия этих белков [132]. Если смесь 14-3-3 ζ и В6 была нанесена на колонку, мы обнаружили два отдельных пика, содержащих либо 14-3-3 ζ , либо В6 (Рис. 31А, Б). Фосфорилированный В6 («рВ6») взаимодействует с 14-3-3 ζ , что сопровождается расходом свободного рВ6 и сдвигом основного пика на профиле элюции влево в связи с образованием белкового комплекса (Рис. 31А). По данным ДСН-электрофореза, этот пик действительно содержит оба белка (Рис. 31Б). Когда ту же смесь рВ6 и 14-3-3 ζ анализировали в присутствии Рi в образцах и колоночном буфере, профиль элюции был очень похож на профиль не взаимодействующих между собой 14-3-3 ζ и В6, и почти весь рВ6 возвращался к своему исходному положению на хроматограмме (Рис. 31Б, фракции 9-11).

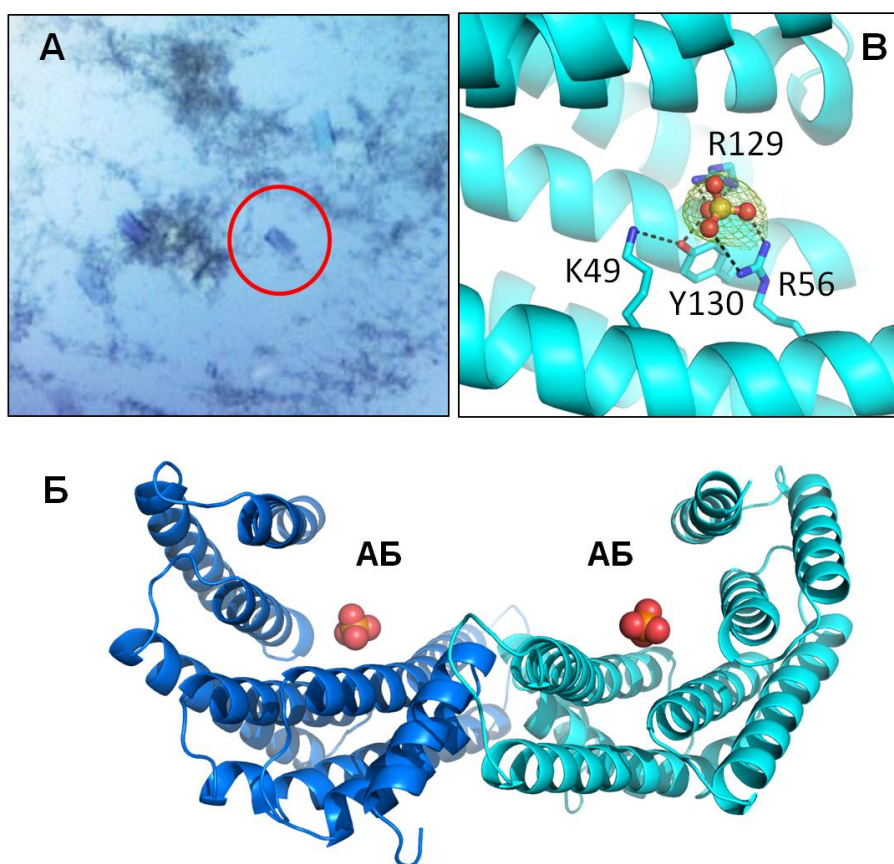


Рис. 32. Кристаллизация 14-3-3 σ в присутствии фосфата (А) приводит к его связыванию в амфипатических бороздках АБ (Б), из-за взаимодействия с аминокислотными остатками К49, R56, R129, Y130 (В). Зеленым для фосфата показана карта разностной электронной плотности F_o-F_c с контуром $1,5\sigma$. Кристаллизационный буфер: 100 мМ имидазол, 0,2 М NaCl, 2 М калий-фосфат, рН 8,0.

14-3-3 γ также образовывал прочные комплексы с рВ6 в Трис-буфере, однако они почти полностью диссоциировали на свои компоненты, если ГФ проводили в присутствии 75 мМ фосфата (Рис. 31В-Е). В этом отношении как 14-3-3 γ , так и 14-3-3 ζ продемонстрировали

сходное поведение, указывая на то, что фосфат ингибирует взаимодействие 14-3-3 с фосфорилированным белком-партнером, предположительно, конкурируя за связывание с амфипатическими бороздками 14-3-3.

Для прямой проверки этой гипотезы мы решили получить кристаллическую структуру 14-3-3 σ в присутствии фосфата (Рис. 32). Несмотря на внешний вид, напоминающий кристаллы неорганических соединений (Рис. 32А), полученные кристаллы принадлежали к пространственной группе $I 21 21 21$ с параметрами ячейки 64,3Å, 110,0Å, 160,6Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, что явно соответствовало белковому кристаллу. Структура была решена с помощью мономера 14-3-3 σ методом молекулярного замещения (Рис. 32А). В асимметричной единице присутствовала одна субъединица 14-3-3, при этом разностная карта электронной плотности F_o-F_c указывала на присутствие в амфипатической бороздке связанного аниона фосфата (Рис. 32В). Подобная структура уже была получена ранее с ионом сульфата [34]. В другой структуре было обнаружено, что ион фосфата опосредует необычное взаимодействие 14-3-3 с нефосфорилированным белком-партнером в АБ [246]. Несмотря на высокую концентрацию фосфата в наших условиях кристаллизации (2 М), в других участках структуры 14-3-3 он связан не был. На наш взгляд, это прямо указывает на то, что фосфат ионы могут конкурировать с фосфорилированными белками-партнерами 14-3-3 за связывание с амфипатической бороздкой 14-3-3. Факт прямого взаимодействия различных анионов, включая ионы сульфата и фосфата, с 14-3-3 γ был показан недавно с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии [464].

Мы решили проверить, насколько специфично и эффективно действие анионов фосфата, и сравнили эффект других анионов на взаимодействие 14-3-3 ζ /pB6, проводя серии экспериментов при разных концентрациях анионов в образцах нанесения и в буфере уравнивания колонки (Рис. 33). Важно, что повышение ионной силы из-за добавленных солей компенсировалось добавлением NaCl таким образом, чтобы ионная сила оставалась практически неизменной.

Оказалось, что даже относительно невысокие концентрации Pi (например, 9,3 и 18,7 мМ) вызывали выраженные изменения профилей элюции, что указывало на диссоциацию белкового комплекса (Рис. 33). В то же время, неорганический сульфат оказывал существенно менее выраженное ингибирование взаимодействия 14-3-3 ζ /pB6 (Рис. 33). Различие в эффектах этих изостерических анионов может быть связано с различиями в их размерах и заряде и может отражать силу их взаимодействия с амфипатической бороздкой 14-3-3. В случае глицерол-1-фосфата, даже при концентрации 9-18 мМ мы наблюдали

заметную дестабилизацию комплекса 14-3-3ζ/pB6 (Рис. 33). Эффект глицерол-2-фосфата был по существу таким же, как и у неорганического фосфата или глицерол-1-фосфата (Рис. 34А). В отличие от них, даже при довольно высоких концентрациях пирофосфат (PPi) был неэффективным ингибитором взаимодействия 14-3-3ζ/pB6 (Рис. 34А). Вероятно, это связано с тем, что фосфоэфирные связи глицерофосфатов идентичны таковым у фосфорилированных белков и отличаются от фосфоангидридных связей, представленных в пирофосфате. Следовательно, эти соединения могут по-разному связываться с 14-3-3.

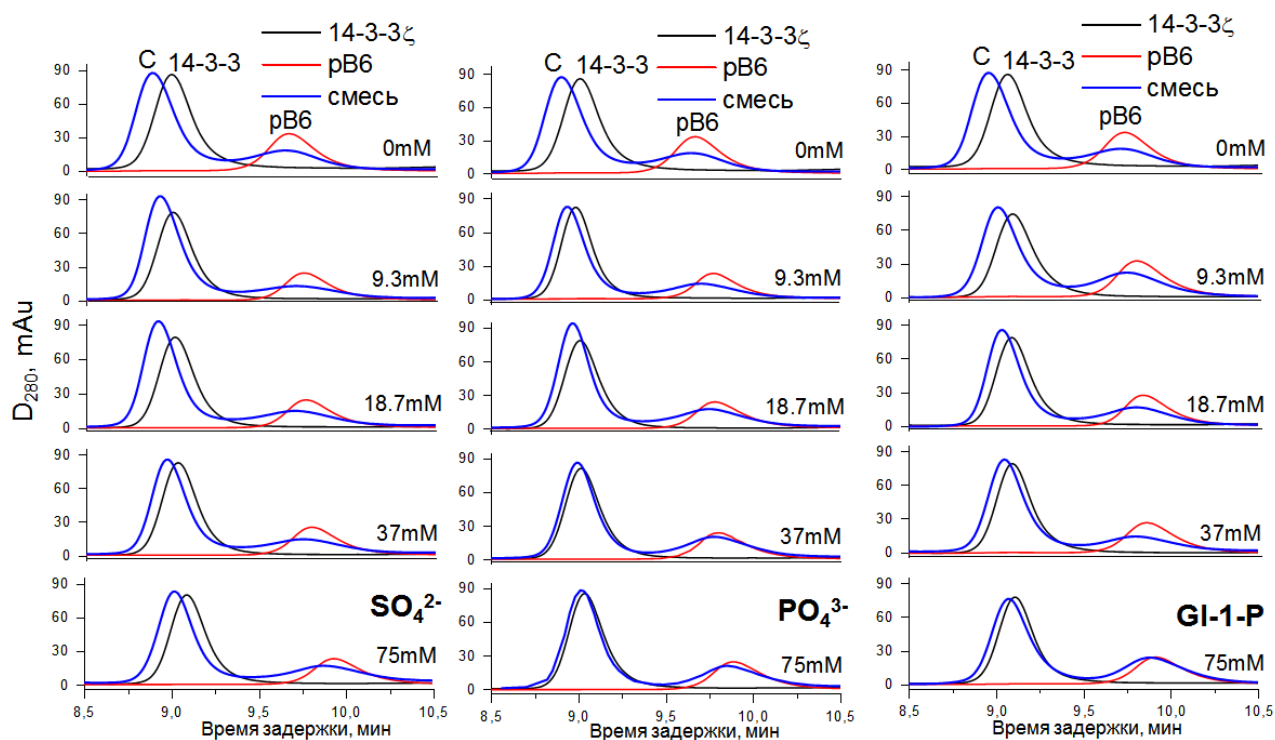


Рис. 33. Эффект сульфата, фосфата и 1-глицерофосфата на взаимодействие 14-3-3 с pB6 по данным гель-фильтрации. Типичные профили элюции 14-3-3ζ, pB6 или смеси взаимодействующих белков наложены друг на друга. В отсутствие анионов наблюдался максимальный сдвиг, связанный с образованием пика комплекса (отмечен «С»). При увеличении концентрации анионов (указана в мМ на каждом графике), сдвиг уменьшался.

Для того чтобы более количественно оценить и сравнить эффективность различных анионов в модуляции взаимодействия 14-3-3ζ/pB6, учитывая особенности полученных профилей элюции, мы рассчитали произведение смещения пика комплекса (параметр P1) и уменьшения амплитуды пика свободного pB6 (параметр P2) для каждой концентрации анионов (P1*P2), что хорошо отражало эффективность образования комплекса в данных условиях. Полученные данные показывают, что Pi и глицерофосфаты даже при концентрации 5-10 мМ значительно дестабилизируют комплексы 14-3-3ζ/pB6, тогда как

пирофосфат и сульфат при гораздо более высоких концентрациях были менее эффективными (Рис. 34А).

АУЦ использовали в качестве независимого метода для проверки данных ГФ. Три пика были обнаружены на распределении $c(s)$ для смеси рВ6 и 14-3-3 ζ в Трис-буфере (Рис. 34Б). Оценка молекулярных масс с использованием распределений $c(M)$ показала, что пик 2,4-2,5 S (31 ± 2 кДа) соответствует димерному рВ6, тогда как два других пика с 4,3-4,6 S (70 ± 4 кДа) и 5,1-5,4 S (91 ± 4 кДа), наиболее вероятно, соответствуют димерному 14-3-3 ζ и его комплексу с рВ6, соответственно. Такое распределение пиков было подтверждено в эксперименте, проведенном при удвоенной концентрации 14-3-3 ζ и такой же концентрации рВ6 (не показано). Анализ скорости седиментации смеси 14-3-3 ζ и рВ6 в присутствии Pi или глицерол-2-фосфата выявил резкое уменьшение пика 5,1-5,4 S (Рис. 34Б), что указывает на то, что эти анионы дестабилизируют комплекс 14-3-3 ζ и рВ6, вызывая его диссоциацию.

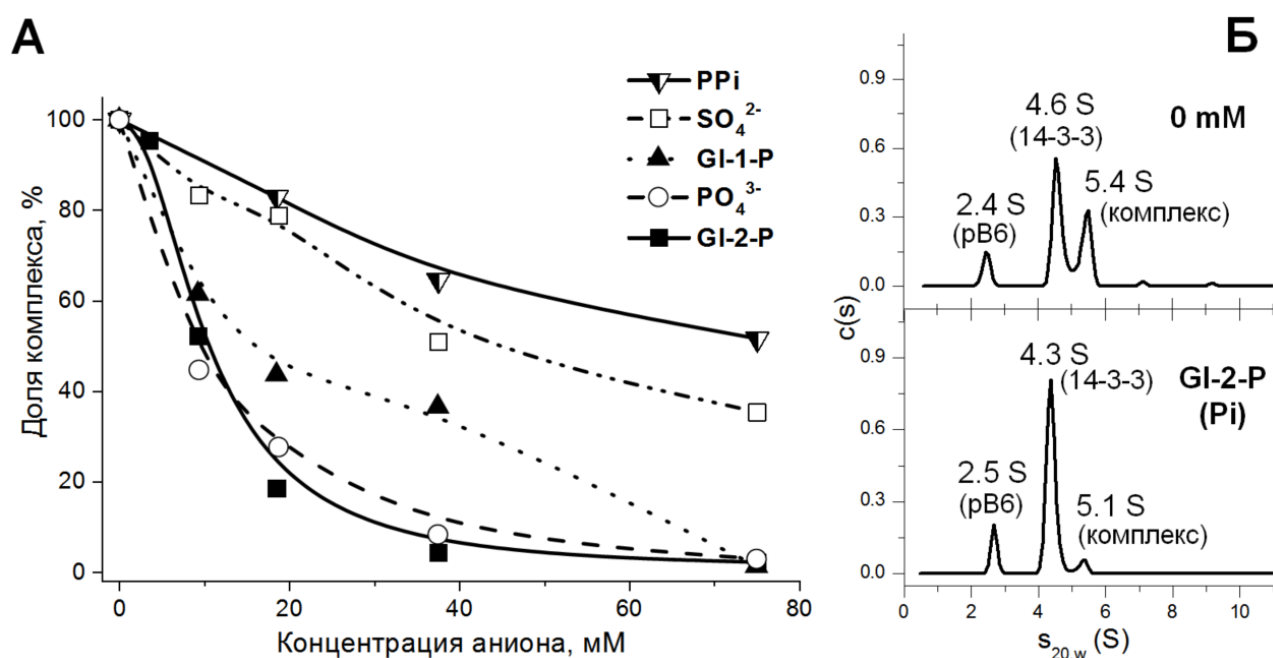


Рис. 34. Эффект анионов на взаимодействие 14-3-3 ζ с рВ6, по данным ГФ (А) и АУЦ (Б). А. Модуляцию различными концентрациями сульфата, пирофосфата, фосфата, а также 1- и 2-глицерофосфата оценивали с помощью произведения двух параметров взаимодействия 14-3-3 ζ /рВ6, наблюдаемых на профилях: смещения пика комплекса относительно положения 14-3-3 (P1) и уменьшения амплитуды пика свободного рВ6 (P2). Параметры P1 и P2 рассчитывалась для каждой концентрации соответствующего аниона. Произведение максимального сдвига (P1) и максимального уменьшения пика рВ6 (P2), наблюдаемых в отсутствие анионов, было принято за 100%. Б. Эффект 40 мМ 2-глицерофосфата на образование комплекса 14-3-3 ζ /рВ6 при АУЦ. Аналогичный эффект, соответствующий почти полному исчезновению пика комплекса, наблюдали для 40 мМ фосфата.

Представленные данные показывают, что фосфат-содержащие соединения в миллимолярных концентрациях сильно влияют на взаимодействие 14-3-3 ζ с фосфорилированным В6, оказывая при этом концентрационно-зависимое действие. Мы предполагаем, что такой эффект фосфата, описанный нами впервые, является общим и может наблюдаться в случае взаимодействия 14-3-3 с различными фосфорилированными партнерами. В подтверждение этого, было показано, что фосфат ослабляет взаимодействие 14-3-3 с нитратредуктазой [465] и ААНАТ [466]. Можно ожидать, что эффективность фосфат-зависимого ингибирования взаимодействия 14-3-3 с белками-мишенями будет зависеть от сродства 14-3-3 к конкретной мишени. В этом случае увеличение концентрации фосфата, наблюдаемое при определенных физиологических условиях (например, после мышечного сокращения [462]), будет избирательно уменьшать (или полностью исключать) взаимодействие 14-3-3 с белками-мишенями, имеющими низкое сродство к 14-3-3 или представленными в низкой концентрации. Можно предположить, что изменения внутриклеточной концентрации фосфата служат своего рода фильтром, модулирующим интерактом белков 14-3-3. Такая гипотеза подтверждается тем, что фосфат является одним из самых представленных анионов в клетке. Концентрация неорганического фосфата в различных мышцах достигает 2-8 мМ, сахарофосфатов – 3-5 мМ, АТФ и фосфокреатина – 3-7 мМ и 20-30 мМ [462, 463]. Более того, при длительном сокращении мышц концентрация Pi возрастает до 20-25 мМ, а концентрация сахаро-фосфата – до 10-12 мМ [462, 463]. Уровни Pi и фосфокреатина также могут претерпевать многократные изменения во время ишемии [467]. Интересно, что совсем недавно было показано прямое связывание инозинмонофосфата (код PDB 6TLF) и пиридоксальфосфата (код PDB 6TM7) в амфипатической бороздке 14-3-3 σ [468]. В любом случае, фосфат-содержащие буферы следует использовать с осторожностью в любых исследованиях, касающихся анализа взаимодействия 14-3-3 с различными мишенями.

Таким образом, полученные нами данные указывают на особую роль, которую играют электростатические взаимодействия 14-3-3 с белком-партнером [469] и фосфорилирование пептидов в их узнавании белками 14-3-3.

3.1.3. Взаимодействие фосфопептидов HSPB6 с белками 14-3-3

Как было сказано выше, белок В6 содержит α -кристаллиновый домен (АКД) ближе к С концу последовательности и протяженный N-концевой домен (NTD). NTD склонен к разупорядоченности и несет остаток Ser16 (Рис. 35А) [313, 314, 348], который хорошо

фосфорилируется под действием циклонуклеотид-зависимых протеинкиназ *in vitro* (Рис. 18 и [308, 323, 326]). Масс-спектрометрическая идентификация фосфопептида, содержащего Ser16, показана на Рис. 24.

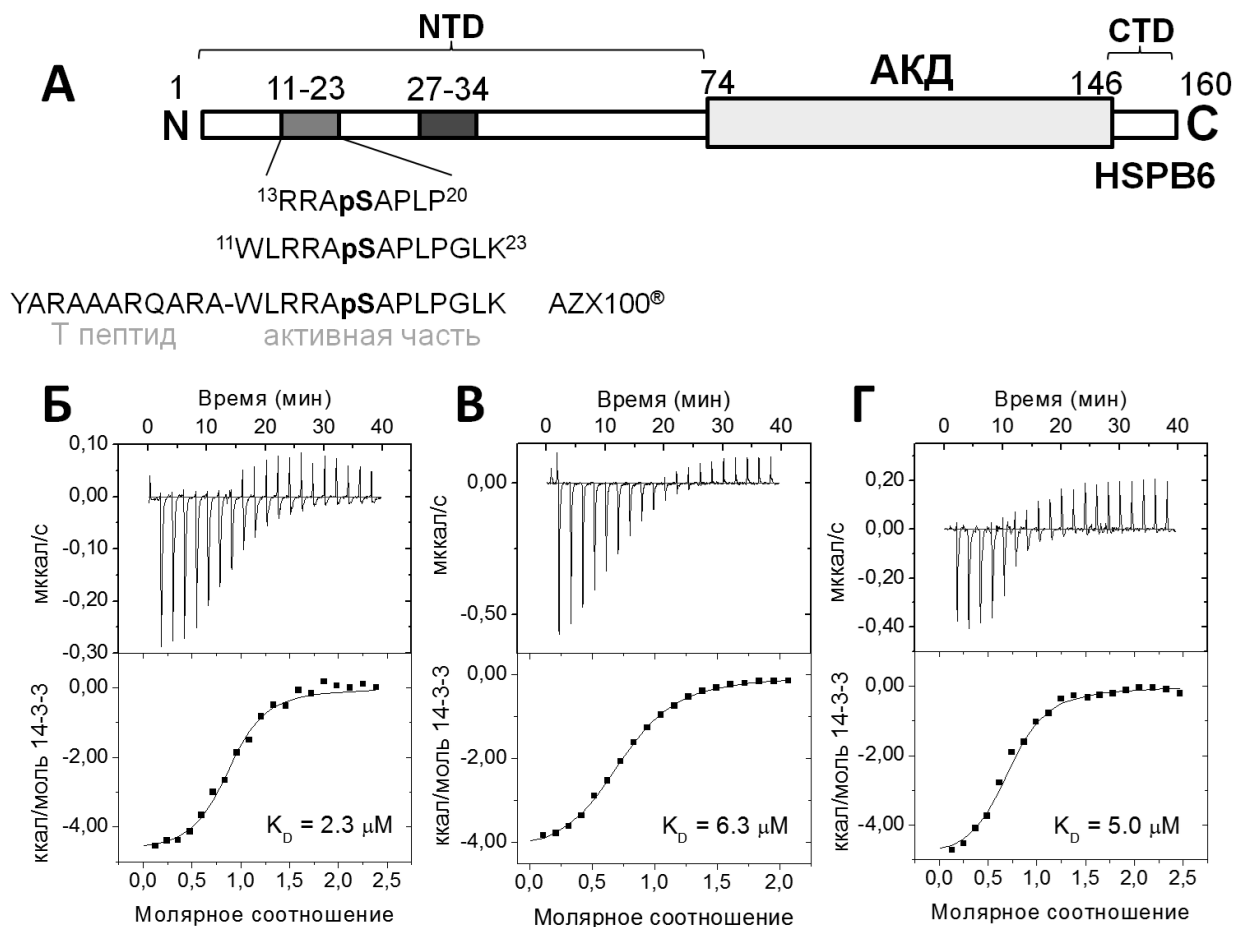


Рис. 35. А. Принципиальная схема В6, на которой показано расположение α -кристаллинового домена (АКД) и разупорядоченных участков NTD и CTD. В работе были синтезированы два фосфопептида (остатки 13-20 и 11-23), содержащих Ser16, последовательности которых приведены в сравнении с последовательностью терапевтического фосфопептида AZX100® (состоит из проникающего Т пептида и активной части). На схеме отмечено расположение пептида 27-34, который является наиболее консервативным участком среди всех малых белков теплового шока. Анализ взаимодействия фосфопептида В6 с 14-3-3 γ (Б), 14-3-3 σ (В) и 14-3-3 ζ (Г) методом ИТК. 85 μM раствор фосфопептида титровали, добавляя к пробе малые аликвоты 1 мМ раствора 14-3-3. Опыты проводили при 30 °С. Указаны кажущиеся константы диссоциации, полученные при фитировании экспериментальных кривых моделью одного сайта связывания (1 пептид : 1 мономер 14-3-3).

Чтобы лучше понять первичное взаимодействие между 14-3-3 и рВ6 на молекулярном уровне, мы использовали два синтетических фосфопептида В6, которые соответствуют остаткам 13-20 и 11-23, соответственно (Рис. 35А). Более длинный фосфопептид 11-23 эквивалентен активной С-концевой части пептида AZX100®, обладающего рядом

физиологических эффектов, повторяющих свойства полноразмерного белка В6 [331, 342, 343]. Эксперименты с использованием изотермической титрационной калориметрии (ИТК) показали, что фосфопептид 11-23 связывается с 14-3-3 γ – преобладающей изоформой в мышечной ткани [470] – с кажущейся K_D равной $2,3 \pm 0,3$ мкМ (Рис. 35Б). Сходное значение было получено с изоформами 14-3-3 σ ($K_D = 6,3 \pm 0,5$ мкМ; Рис. 35В) и 14-3-3 ζ ($K_D = 5,0 \pm 0,4$ мкМ; Рис. 35Г) человека, причем во всех случаях наблюдалась ожидаемая стехиометрия связывания: один пептид на субъединицу 14-3-3. Следует отметить, что эти взаимодействия сильнее, чем, например, связывание фосфопептидов C-RAF ($K_D = 16,7 \pm 2,0$ мкМ с 14-3-3 ζ [149]) и p53 ($K_D = 16,3 \pm 0,7$ мкМ с 14-3-3 σ [148]). Такая прочность первичного взаимодействия указывает на достаточно высокую стабильность комплексов между полноразмерным фосфорилированным В6 и 14-3-3 (см. ниже).

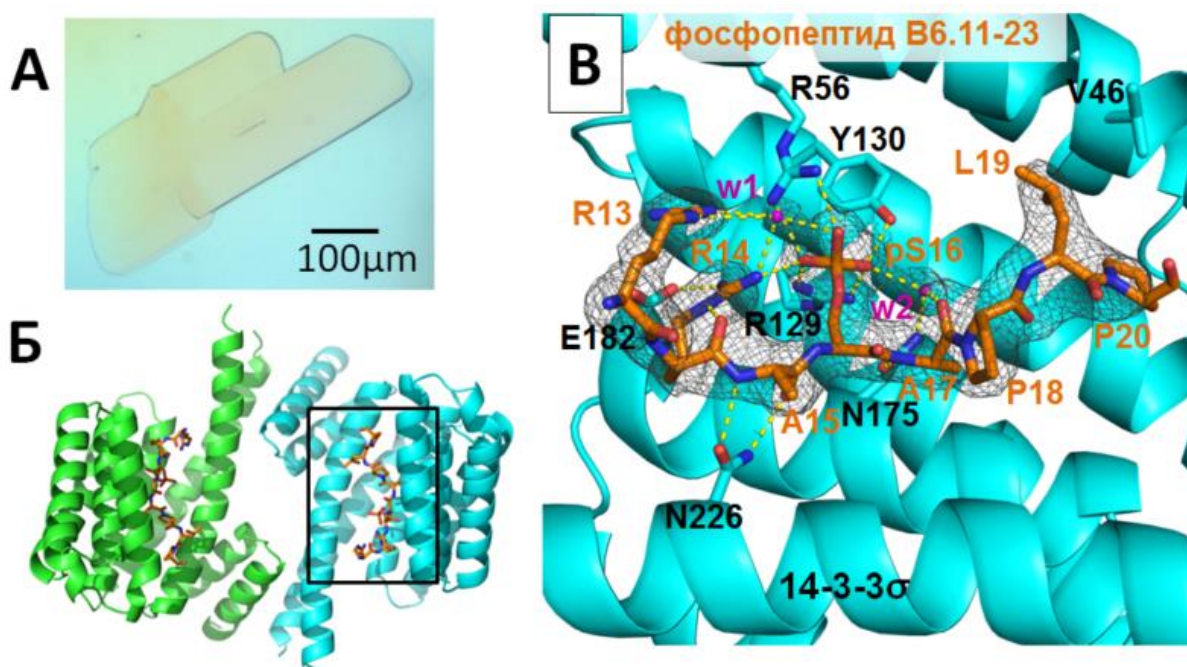
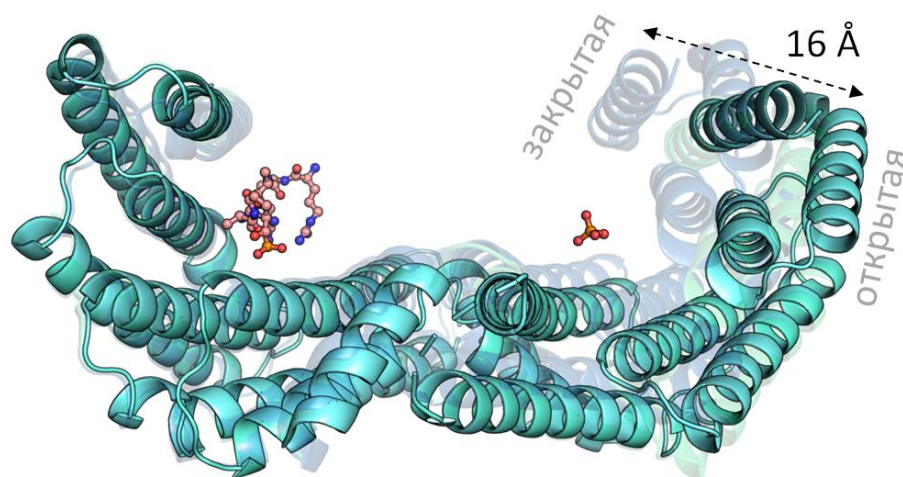


Рис. 36. Кристаллическая структура комплекса 14-3-3 σ с фосфопептидом В6.11-23, полученная с разрешением 2,5 Å (код PDB 5LU2). А. Кристалл комплекса 14-3-3 σ с фосфопептидом, использованный для решения структуры. Б. Связывание фосфопептидов в обеих АБ димера 14-3-3. В. Крупный план показывает карту электронной плотности 2Fo-Fc (серая сетка, контур на 1 σ) для фосфопептида (оранжевый) и упорядоченных молекул воды (w1, w2, пурпурные), полярные контакты отмечены желтыми пунктирными линиями.

Мы ко-кристаллизовали 14-3-3 σ человека с каждым фосфопептидом В6.13-20 и В6.11-23 и определили атомные структуры с разрешением 2,4 (код PDB 5LU1) и 2,5 Å (код PDB 5LU2, Рис. 36), соответственно. Пептиды связываются в АБ молекулы 14-3-3 в идентичных конформациях (Рис. 36). Для обоих фосфопептидов только упорядоченные остатки 13-20

были обнаружены в карте электронной плотности. По всей видимости, находящиеся за их пределами остатки подвижны и не являются критически важными для связывания. Фосфатная группа пептида образует солевые мостики с консервативными остатками Arg56 и Arg129 14-3-3 σ и связана водородной связью с остатком Tyr130 (Рис. 36В). Атомы основной цепи остатков, непосредственно примыкающих к фосфосерину, то есть Ala15 и Ala17, связаны водородными связями с остатками 14-3-3 Asn226 и Asn175, соответственно. Кроме того, стабилизирующие взаимодействия наблюдаются внутри самого фосфопептида, так как Arg14 непосредственно координирует фосфатную группу остатка pS16 (и также образует солевой мостик с остатком Glu182 14-3-3), в то время как каждый из остатков Arg13 и Ala17 контактирует с фосфатной группой пептида через упорядоченные молекулы воды w1 и w2. Наконец, остатки Leu19 и Pro20 пептида участвуют в формировании гидрофобных контактов с остатком Val46 α 3-спирали 14-3-3 (Рис. 36В).



димер 14-3-3 σ

Рис. 37. Пластичность конформации 14-3-3 при связывании лигандов. Слева показана закрытая конформация субъединицы 14-3-3 в комплексе с фосфопептидом pB6. Справа показаны три наложенных друг на друга конформации, наблюдаемые в кристаллических структурах 14-3-3 σ (коды PDB 5OKF и 5OMA), которые дают диапазон от самой закрытой до самой открытой. Примечательно, что в отличие от фосфопептида, открытая конформация совместима со связыванием иона фосфата (отмечен в виде желтой пирамидки в правой части рисунка) в амфипатической бороздке. Амплитуда конформационного изменения между открытой и закрытой конформациями достигает 16 Å.

Таким образом, фосфопептид контактирует с обеими – нижней и верхней – поверхностями амфипатической бороздки 14-3-3, в результате чего α -спирали 14-3-3 как бы охватывают фосфопептид. С течением времени мы получили множество разных кристаллических структур пептидных комплексов 14-3-3, в которых конформация субъединиц заметно отличалась. Более того, были получены структуры, в которых в

амфипатической бороздке 14-3-3 мог быть связан анион фосфата или сульфата из условий кристаллизации, при этом конформация субъединицы, в которой он был связан, была сильно раскрыта по сравнению со конформацией фосфопептид-связанной субъединицы даже в пределах одного димера 14-3-3 (Рис. 37). Фактически, различные структуры демонстрировали различное положение α -спиралей 14-3-3 от самой закрытой до самой открытой конформации, с общей амплитудой, достигающей 16 Å (Рис. 37). Любопытно, что асимметричный гомодимер 14-3-3 β с субъединицами в закрытой и более открытой конформации в апоформе был независимо получен в другой работе (код PDB 2BQ0) [114]. Мы предполагаем, что такие конформационные изменения имеют место в процессе связывания лигандов, для адаптации и захвата белками 14-3-3 пептидов с различной химической структурой и объемностью. Такая гипотеза подтверждается молекулярно-динамическими расчетами, выполненными в других работах [299, 471].

3.1.4. Взаимодействие полноразмерного HSPB6 с белками 14-3-3

Таким образом, значительную роль во взаимодействии димера 14-3-3 и димера pB6 играют фосфопептиды B6, включающие остаток фосфосерина-16, которые связываются в AB каждой из двух субъединиц 14-3-3. Это предполагает образование гетеродимерного комплекса со стехиометрией 2:2. Имея в виду эти сведения, мы перешли к анализу взаимодействия в контексте полноразмерного фосфорилированного B6.

Вначале мы провели эксперименты ИТК, однако они выявили сложную тепловую диаграмму, которая, хоть и говорила в пользу многоступенчатости процесса сборки комплекса 14-3-3 с полноразмерным B6, была слишком сложна для однозначной интерпретации (здесь не представлено). Вместо этого мы прибегли к помощи флуоресцентной спектроскопии. С этой целью фосфорилированный полноразмерный белок B6 был стехиометрически помечен по единственному остатку Cys46, находящемуся в разупорядоченном NTD, меткой 1,5-I-AEDANS, чувствительной к молекулярному окружению [472, 473]. Меченый фосфорилированный B6 (pB6*) давал на профиле гель-фильтрации симметричный пик с кажущейся массой около 50 кДа, что соответствует его димеру (Рис. 38А). Наличие полноспектральной детекции поглощения и настраиваемой флуоресцентной детекции при проведении гель-фильтрации позволило зарегистрировать спектр поглощения для элюирующегося с колонки pB6* и оценить степень мечения (выше 90%) (Рис. 38А). Принципиально важно, что меченый pB6* проявлял способность

взаимодействовать с 14-3-3σΔС, давая характерное смещение пика комплекса на профиле элюции влево (Рис. 38). Кажущаяся молекулярная масса комплекса 95 кДа подтверждала стехиометрию связывания 2:2, поскольку кажущиеся массы свободных 14-3-3σΔС и pB6* составили 52 и 45 кДа, соответственно. За смещением pB6* в пик комплекса можно было избирательно следить в канале флуоресценции AEDANS непосредственно во время элюции (Рис. 38). Таким образом, модификация Cys46 в фосфорилированном B6 флуоресцентной меткой AEDANS не нарушает 14-3-3-связывающие свойства pB6.

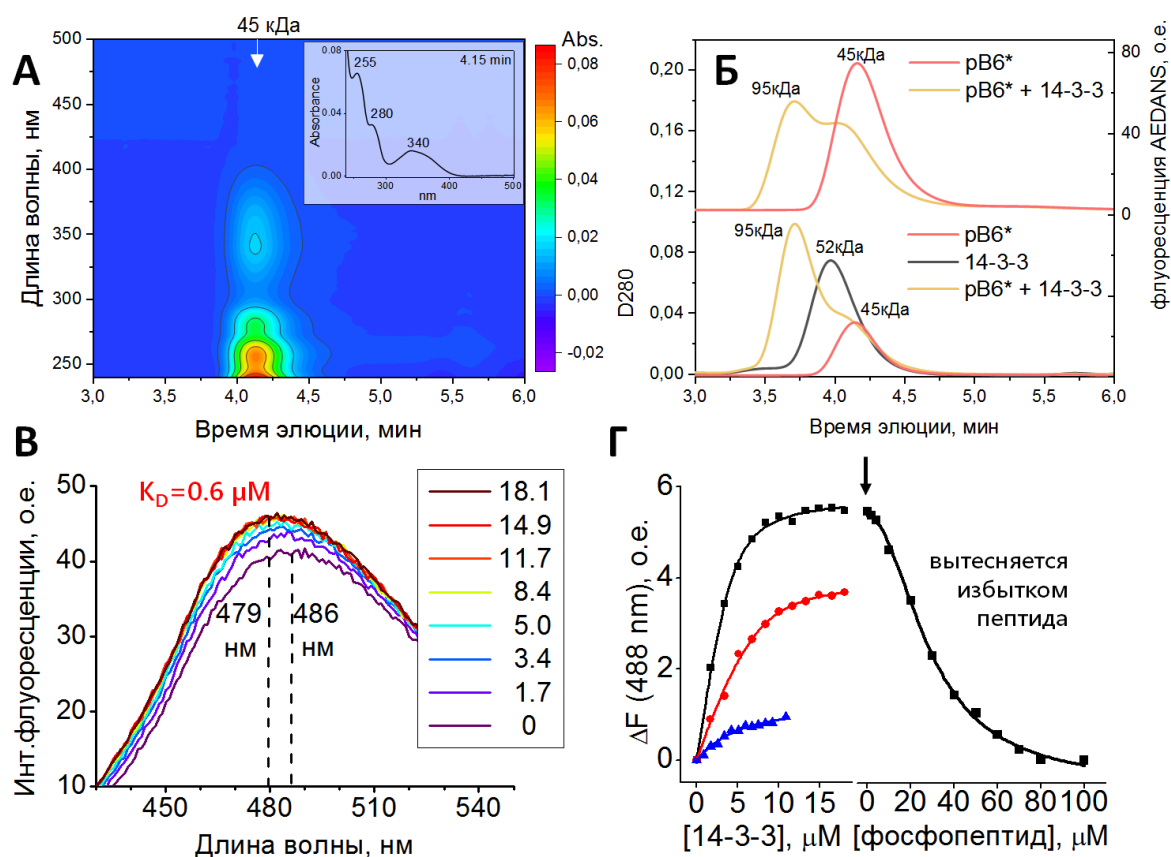


Рис. 38. Взаимодействие pB6, меченного AEDANS (pB6*), с 14-3-3σ. А. Спектрохроматографический профиль элюции pB6* с колонки Superdex200 Increase 5/150, полученный при ГФ с детекцией полного спектра поглощения (240-500 нм) при скорости 0,45 мл/мин. Стрелка показывает положение максимума пика димерного pB6*. Вставка показывает спектр поглощения в максимуме пика на профиле элюции с характерным для AEDANS пиком на 340 нм. Б. pB6* взаимодействует с 14-3-3σΔС при ГФ с детекцией поглощения при 280 нм (нижняя часть) и флуоресценции AEDANS (340/490 нм, верхняя часть графика). Указаны кажущиеся массы, полученные при калибровке колонки. В. Изменения в спектре флуоресценции AEDANS (возбуждение при 336 нм) для раствора 4,2 μM pB6* при титровании увеличивающимися концентрациями 14-3-3σ (указаны в μM, кодированы цветом). Г. Изменения интенсивности флуоресценции (ΔF) при 488 нм при титровании 4,2 μM раствора pB6* белком 14-3-3σ в отсутствие фосфопептида В6 с последующим (в момент времени, обозначенный стрелкой) титрованием фосфопептидом. Альтернативно, ΔF измеряли для pB6* с концентрацией 4,2 μM (красная линия, кружки) или 2,8 μM (синяя линия, треугольники) в присутствии 4,2 μM или 20 μM фосфопептида, соответственно, титруя с помощью 14-3-3σ.

При титровании pB6* с помощью раствора 14-3-3σ пик флуоресценции AEDANS смещался с 486 до 479 нм, а его амплитуда вырастала вплоть до точки насыщения (Рис. 38В). Любопытно отметить, что наблюдаемый ~ 7 нм синий сдвиг флуоресценции AEDANS может отражать его смещение в более защищенное от растворителя положение при образовании комплекса с 14-3-3. Полученная кривая связывания позволила определить кажущуюся K_D полного комплекса 14-3-3σ/pB6*, которая составила $0,56 \pm 0,2$ мкМ, что существенно ниже константы диссоциации, полученной для взаимодействия этой же изоформы 14-3-3 с фосфопептидами В6 (6,3 мкМ, Рис. 35В). Это означает, что взаимодействие 14-3-3σ с интактным pB6 значительно сильнее, чем взаимодействие с фосфопептидом В6.11-23. В подтверждение этого, последующее титрование насыщенного комплекса 14-3-3σ/pB6* увеличивающимся количеством немеченного фосфопептида 11-23 привело к сигмоидальному затуханию сигнала флуоресценции со значением IC_{50} , равным $28,9 \pm 0,9$ мкМ (Рис. 38Г). Такое значение IC_{50} означает, что только избыток фосфопептида может вытеснить полноразмерный меченый pB6 из комплекса с 14-3-3. Более того, титрование pB6* раствором 14-3-3σ в присутствии эквимольной концентрации фосфопептида (по отношению к pB6*) и даже в присутствии 7-кратного избытка последнего также приводило к насыщаемой кривой (Рис. 38Г), свидетельствующей в пользу сохраняющихся полных комплексов 14-3-3σ/pB6*. Эти конкурентные эксперименты позволили провести с помощью подхода Wang [369] независимую оценку кажущейся константы диссоциации комплекса 14-3-3σ/фосфопептид, которая составила $5,2 \pm 0,5$ мкМ, в хорошем соответствии с данными ИТК (Рис. 35В).

Полученная константа диссоциации комплекса 14-3-3 с полноразмерным pB6 указывает на его более высокую аффинность к 14-3-3 по сравнению с фосфопептидами. Это может быть связано с кооперативным по сравнению с монофосфорилированными пептидами связыванием дважды фосфорилированного димера В6 в обеих АБ 14-3-3, что является ожидаемым для дважды фосфорилированных лигандов 14-3-3 [34, 154, 158, 159]. Также более высокое сродство полноразмерного белка предполагает многоточечный характер взаимодействия в полноразмерном комплексе. Важно, что связывание полноразмерного pB6* с 14-3-3σ ингибировалось в присутствии фосфопептида pB6.11-23, а уже связанный pB6^{AEDANS} вытеснялся из комплекса при добавлении фосфопептидов (Рис. 38Г). Таким образом, связывание фосфопептидов с АБ в димере 14-3-3 является определяющим, однако нельзя исключить наличие дополнительных взаимодействий в стабилизации архитектуры комплекса.

3.1.5. Кристаллическая структура полноразмерного комплекса 14-3-3 и HSPB6

Поскольку нам удалось выявить и охарактеризовать участки первичного взаимодействия 14-3-3 с фосфорилированным белком B6, которые основаны на взаимодействии фосфопептидов B6 в амфипатических бороздках димера 14-3-3, и комплекс полноразмерных белков был достаточно прочным, мы начали попытки его кристаллизации. Для этого были необходимы большие количества гомогенного препарата стехиометрически фосфорилированного белка B6, связанного с 14-3-3 в правильной стехиометрии 2:2, что требовало продуманного подхода с учетом целого ряда сложностей. Например, первая структура комплекса 14-3-3 с белком-партнером AANAT, установленная в 2001 году Obsil с соавт. [163], несмотря на то, что оказалась прорывом в исследовании комплексов 14-3-3, была получена в ненативной стехиометрии 2:2, поскольку AANAT удавалось получить только в форме, усеченной с С-конца и поэтому лишенной второго важного участка связывания 14-3-3 в районе остатка Ser205 (ожидаемая нативная стехиометрия – 2:1, т.е. димер 14-3-3 на дважды фосфорилированный мономер AANAT [138, 240]) [163] (Рис. 11). Таким образом, взаимодействие 14-3-3 с С-концевым фосфопептидом AANAT, включающим Ser205, до сих пор не охарактеризовано.

Получение стехиометрически фосфорилированного B6 было необходимо для формирования комплекса с 14-3-3. Несмотря на то, что B6 является хорошим субстратом, эффективно фосфорилируемым PKA по остатку Ser16 *in vitro* и *in vivo* [323], простым фосфорилированием *in vitro* было тяжело получить необходимые для кристаллизации количества белка B6 человека, полностью фосфорилированного по Ser16, но не фосфорилированного по второму, минорному участку в районе Ser59. Наряду с Ser16 этот остаток также может фосфорилироваться *in vitro* под действием PKA, но не PKG, по данным литературы [323] (Рис. 18). Для получения корректно фосфорилированного B6 ранее была предложена система ко-экспрессии белка-субстрата и PKG в клетках *E. coli*, которая позволяла получать полноразмерный и функционально активный белок, фосфорилированный по Ser16 [340].

Несмотря на все попытки, нам не удалось получить плазмиду PKG для ко-экспрессии у авторов оригинальной статьи. С учетом данных о том, что PKG продуцируется в клетках *E. coli* в основном в тельцах включения [340, 474] и не может быть использована для получения больших количеств фосфорилированного B6 для ко-кристаллизации с 14-3-3, мы решили создать свою систему ко-экспрессии на основе доступной PKA (Рис. 39А). Для этого были

использованы вектора рЕТ23-В6 и рАСУС-РКА, совместимые по орижинам репликации и по устойчивости к антибиотикам, а потому пригодные к параллельной экспрессии обоих белков в одной клетке. В результате был получен препарат белка В6, который был фосфорилирован по остатку Ser16 по данным масс-спектрометрического анализа (был идентифицирован триптический фрагмент с массой 1429,7 Да (Рис. 24)), а также давал полный сдвиг полосы при гель-электрофорезе в нативных условиях (Рис. 39Б). Полученный полностью фосфорилированный белок был использован для формирования гетеротетрамерного комплекса с 14-3-3, который был отделен от избытка рВ6 при помощи гель-фильтрации (Рис. 39В).

Были получены комплексы рВ6 с каждой из семи изоформ 14-3-3 человека, однако при проведении полномасштабного кристаллизационного скриннинга (более 8000 уникальных условий кристаллизации) мы обнаружили образование кристаллов только в случае 14-3-3 σ . Любопытно отметить, что вначале была оптимизирована призмовидная кристаллическая форма кристаллов, полагаясь на классические принципы кристаллографии, мы старались вырастить наибольшие по размеру кристаллы с наиболее правильной геометрической формой. В результате нам удалось получить действительно большие кристаллы $P6x22$ группы (Рис. 39Г), однако они давали дифракцию не далее 8 Å, и нам не удавалось решить структуру, используя эти данные. Потерпев неудачу с призмовидными кристаллами, мы сосредоточили внимание на кристаллах пластинчатой формы в пространственной группе $C2221$ (Рис. 39Д), которые дифрагировали до 6 Å и давали кристаллографическое решение даже на таком низком разрешении.

Для повышения разрешения мы использовали серии укороченных мутантных форм как рВ6, так и 14-3-3 σ , с минимальным количеством концевых гибких сегментов. Эффективным оказалось применение конструкций 14-3-3 $\sigma\Delta C$ (остатки 1-231) и рВ6 ΔC (остатки 1-149), однако сходные макрокристаллы воспроизводимо росли в течение нескольких дней для комплекса 14-3-3 σ (1-231) с каждым из следующих вариантов рВ6: полноразмерный (1-160), 1-149 и 7-153. Выбор конструкции рВ6 не влиял принципиально на кристаллизацию. Далее мы провели анализ последовательности 14-3-3 σ и выявили несколько участков, в которых подряд располагаются несколько заряженных аминокислотных остатков (Рис. 40), что создает область с повышенной поверхностной энтропией и потенциально может мешать формированию кристаллических контактов [355]. Такие участки были заменены на остатки аланина, что повысило количество, скорость роста и качество кристаллов комплекса рВ6 и модифицированного таким образом 14-3-3 $\sigma\Delta C$. Сочетание всех

описанных подходов, а также использование более сотни оптимизированных кристаллов и сбор данных с использованием спиральной съемки на станции синхротрона с микрофокусом позволило улучшить дифракцию и решить кристаллическую структуру с разрешением 4,5 Å (код PDB 5LTW, Рис. 41 и Рис. 42). Для уточнения этой структуры была использована структура 14-3-3σ с пептидом pB6.11-23 (код PDB 5LU2, 2,5 Å), а также структура B6 АКД с синтетическим N-концевым пептидом 2-10 (код PDB 5LUM, 2,6 Å, Рис. 42B), полученные отдельно.

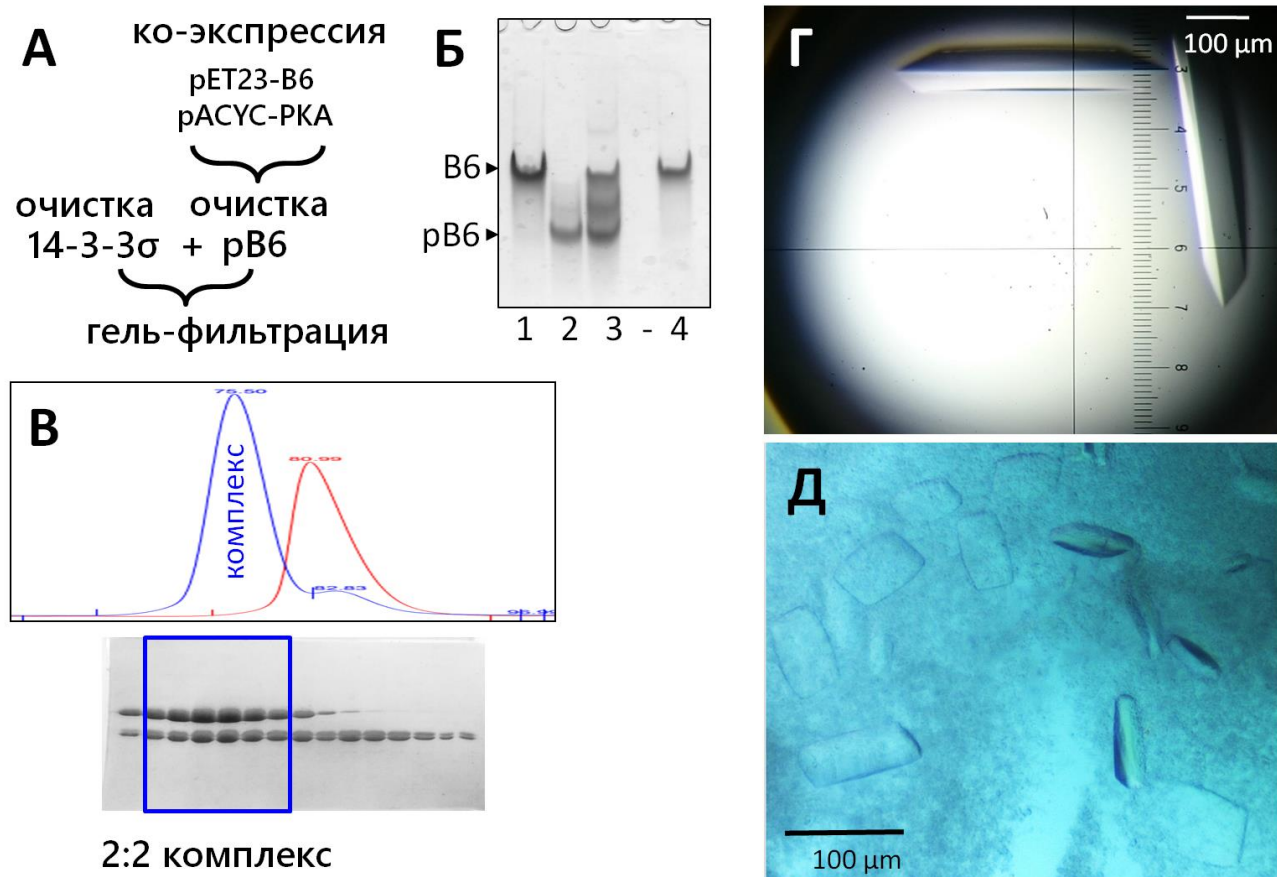

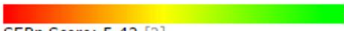



Рис. 39. Получение комплекса 14-3-3 с полноразмерным pB6 (А-В) и его кристаллизация (Г,Д). А. Схема получения фосфорилированного B6 при ко-экспрессии с каталитической субъединицей RKA и его комплекса с 14-3-3. Б. По данным нативного электрофореза, ко-экспрессированный с RKA белок B6 был полностью фосфорилирован. 1 и 4 – B6 без RKA, 2 – B6 с RKA, 3 – частично фосфорилированный препарат B6. Фосфорилированный B6 и 14-3-3 были очищены отдельно, а затем избыток pB6 был смешан с 14-3-3 для образования комплекса. В. Гетеротетраммерный комплекс (2:2) был отделен от избытка pB6 с помощью ГФ и закристаллизован. Несмотря на правильную форму и большие размеры, наиболее перспективные кристаллы (Г) плохо дифрагировали. Оптимизация другой кристаллической формы (Д) позволила решить структуру.

А Предложенные мутации в 14-3-3σ:

Cluster #1:	Residues 159 - 161: KKE [?]
• K 159 => A	
• K 160 => A	SERp Score: 6.17 [?]
• E 161 => A	
Cluster #2:	Residues 31 - 34: QKAKLAEQAERYEDMAAFMKGAVERKGE [?]
• E 31 => A	
• K 32 => A	SERp Score: 5.42 [?]
• E 34 => A	
Cluster #3:	Residues 75 - 77: EQKSNEEGSEEGPVEVREYREKVVETELQ [?]
• E 75 => A	
• E 76 => A	SERp Score: 4.73 [?]
• K 77 => A	

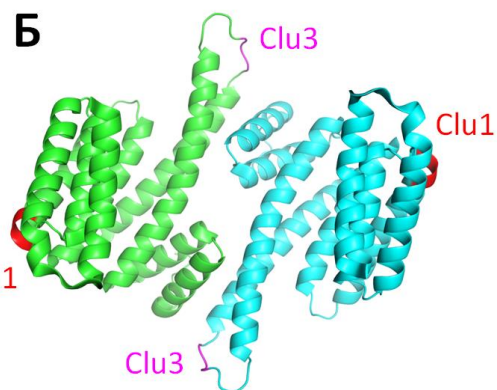


Рис. 40. Анализ наличия в последовательности 14-3-3σ участков с повышенной поверхностной энтропией с целью их замены для повышения кристаллизуемости. А. Результаты предсказания по данным сервера *Surface Entropy Reduction* [355, 475], которые показывают наличие в 14-3-3σ трех кластеров повышенной поверхностной энтропии (Cluster 1-3, в порядке снижения перспективности замены). Б. Расположение найденных участков в структуре 14-3-3σ. Кластер 2 был проигнорирован, поскольку не является непрерывным. Два других кластера были использованы для получения соответствующих аланиновых мутантов Clu1 и Clu3.

В независимой части кристаллической структуры находится три комплекса 14-3-3σ/рВ6. Несмотря на различия в контактах кристаллической решетки, сформированных каждым из комплексов, общая структура всех трех копий комплекса очень похожа (Рис. 41). Связывание рВ6 не вызывает каких-либо существенных конформационных изменений в димере 14-3-3 (Ca r.m.s.d. 0,90 Å по сравнению со структурой комплекса 14-3-3 с фосфопептидом). Примечательно, что хотя оба фосфорилированных NTD белка В6 взаимодействуют с АБ димера 14-3-3 одинаковым образом, димер В6 АКД присоединяется только к одной субъединице 14-3-3, что приводит к неожиданной асимметричной структуре (Рис. 42). Связывание включает две С-концевые α-спирали молекулы 14-3-3, образующие антипараллельный мотив, и три поверхностных петли (соединяющих складки β3-β4, β5-β7 и β8-β9, соответственно) ближайшего мономера В6 АКД. Интерфейс связывания имеет солевой мостик между Arg224 (14-3-3) и Glu86 (В6 АКД) и скрывает около 400 Å² поверхности, что соответствует 4,3% общей доступной поверхности димера АКД, указывая на потенциальную специфичность этого интерфейса (Рис. 41).

Структура комплекса 14-3-3σ/рВ6 показывает, что В6 АКД, состоящий из β-сэндвича, димеризуется с помощью интерфейса так называемого АРП типа, при котором складки β7 каждого мономера находятся в регистре [315]. Это подтверждает, что такой способ димеризации АКД малых белков теплового шока млекопитающих предпочтителен [309, 348, 476]. Димер АКД имеет относительно плоский общий β-лист, полученный в результате

контакта $\beta 7$ - $\beta 7$ складок (Рис. 42), точно так же, как в кристаллической структуре усеченного В6, лишённого остатков 1-56 с N-конца [313] ($C\alpha$ r.m.s.d. 0,79 Å при наложении димеров), а не изогнут, как следовало из данных ЯМР для АКД α В-кристаллина [477]. Кроме того, наша структура показывает, что в полном размере В6 АКД начинается с $\beta 3$ складки (остатки 74-79), в отличие от HSPB1, HSPB2 и HSPB5, которые, по-видимому, содержат дополнительную короткую $\beta 2$ складку [476, 478].

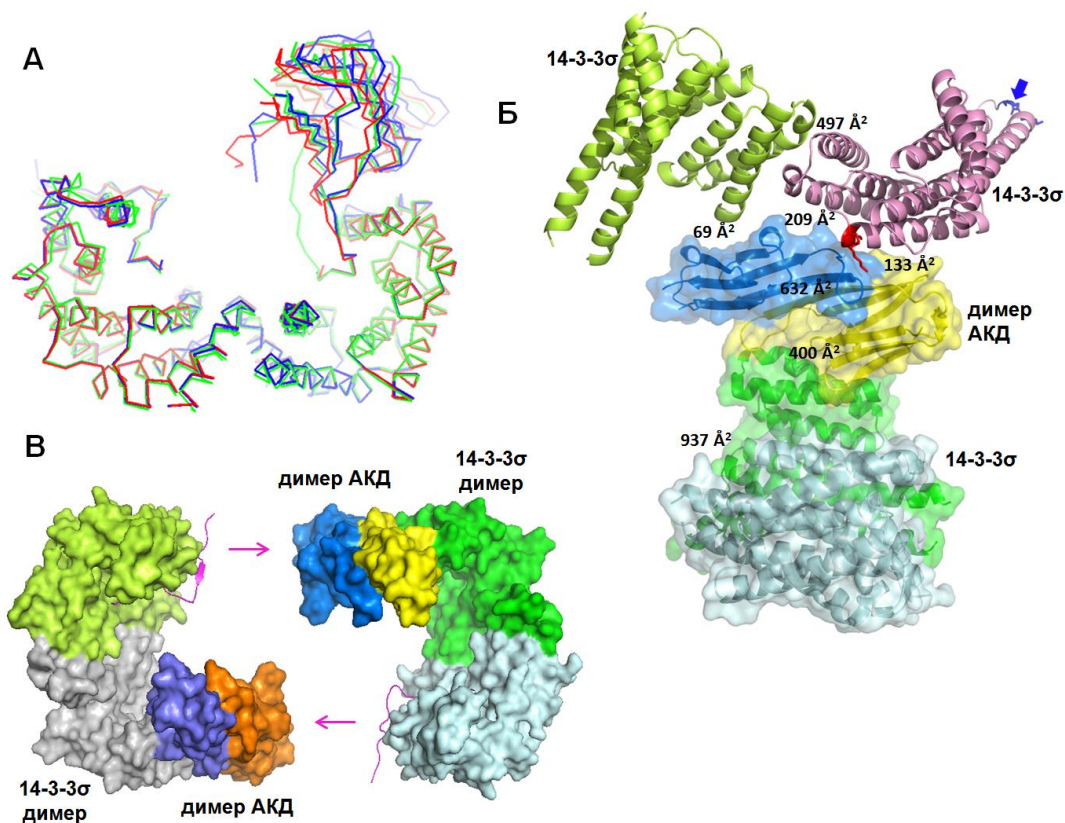


Рис. 41. Особенности кристаллической структуры комплекса 14-3-3 σ /pV6. А. Суперпозиция основной цепи для трех комплексов асимметричной единицы (красный, зеленый и синий). Комплексы наложены по димерам 14-3-3. Б. Кристаллические контакты, образованные одним гетеротетрамерным комплексом (показаны в виде лент и поверхности; NTD опущены) с двумя субъединицами 14-3-3 от соседних комплексов в решетке (показаны в виде лент). Числа показывают площади интерфейсов по данным *PISA* [444]. Димер АКД вклинивается между тремя молекулами 14-3-3 в решетке, но интерфейс с цепью 14-3-3 в гетеротетрамере является самым большим (400 Å²). Такая упаковка стабильна даже в отсутствие N-концевого пептида, так как гетерокомплекс усеченного с N-конца pV6(7-153) дает ту же кристаллическую решетку. Тройная замена ¹⁵⁹AAA¹⁶¹ (Clu1), используемая для улучшения кристаллизации комплекса 14-3-3 σ /pV6, выделена красным на одной (розовой) 14-3-3 субъединице. Она расположена в α -спирали 14-3-3 и вступает в контакт с петлей, соединяющей $\beta 5$ и $\beta 7$ -складки В6 АКД (синий). Синей стрелкой обозначено положение тройной замены ⁷⁵AAA⁷⁷ (Clu3), которая была использована для кристаллизации комплекса с пептидом pV6. Эта мутация находится в экспонированной петле, соединяющей 3 и 4 α -спирали 14-3-3. В. Контакт кристаллической решетки между двумя гетеротетрамерами 14-3-3 σ /pV6, представленными в виде поверхностей молекул. N-конец типа II (пурпурный) стабилизирует сборку, контактируя с В6 АКД другого гетеротетрамера.

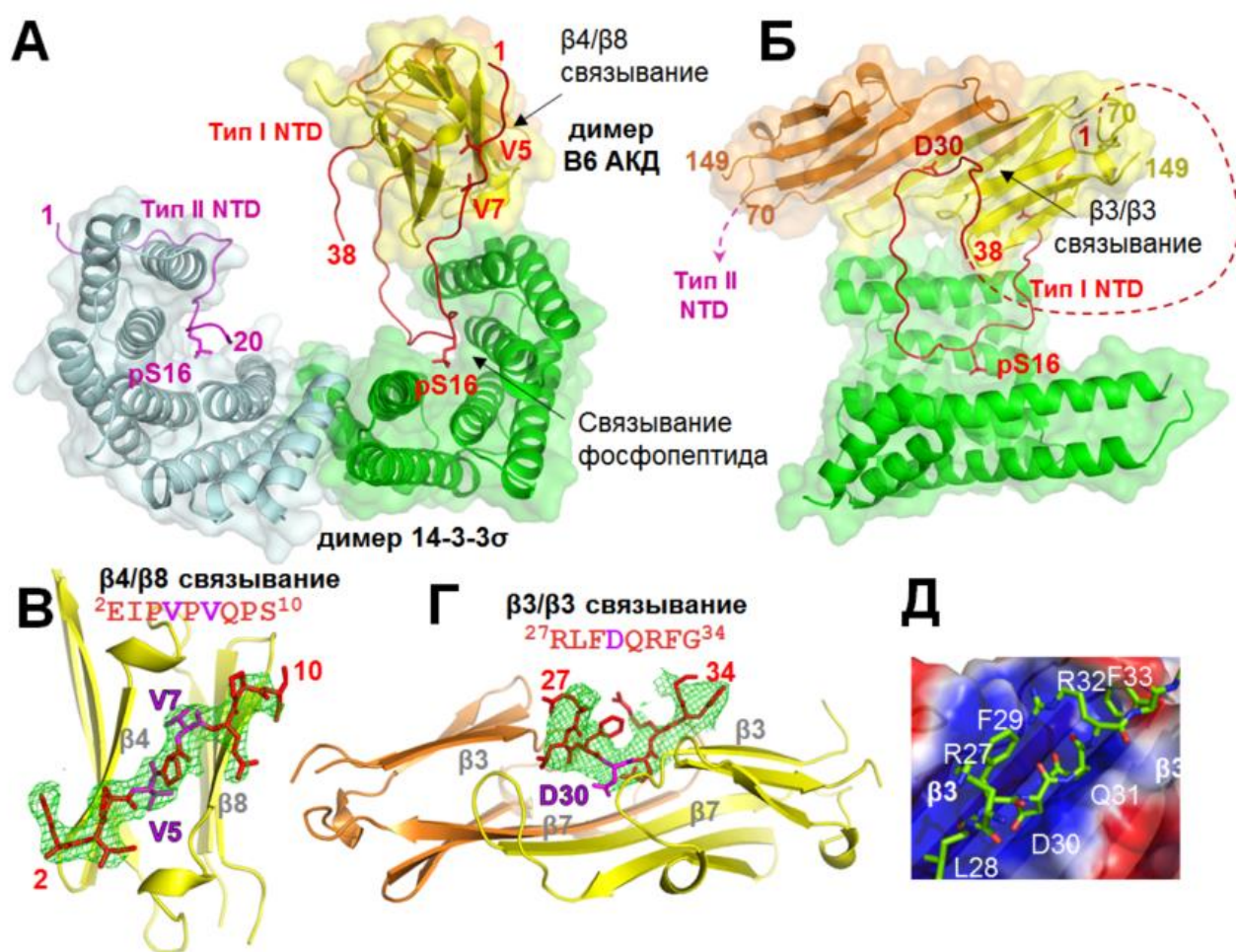


Рис. 42. Кристаллическая структура полного комплекса 14-3-3σ/pB6 (код PDB 5LTW, разрешение 4,5Å). А,Б. Ленточная диаграмма гетеротетрамера в двух перпендикулярных проекциях (на панели Б вторая молекула 14-3-3 опущена для наглядности). Упорядоченные части NTD В6 типа I и II окрашены в красный и пурпурный цвета, соответственно. Важные остатки отмечены номерами, показаны полупрозрачные поверхности димера 14-3-3 и димера АКД. Из-за разупорядоченности остатков 39-69 существует неоднозначность соединения N-концевых частей и АКД: NTD I типа может соединяться с АКД желтого цвета, а NTD II типа – с АКД оранжевого цвета (как показано пунктирными линиями на панели Б), или наоборот. В. Связывание в $\beta 4/\beta 8$ бороздке АКД, наблюдаемое в его ко-кристаллах с N-концевым пептидом ${}^2\text{EIPVPVQPS}^{10}$ (код PDB 5LUM, разрешение 2,6 Å). Для наглядности показана только одна цепь АКД. Разностная “omit” Fo-Fc карта электронной плотности для пептида показана с контуром $2,5\sigma$ (зеленая сетка). Г. Связывание в $\beta 3/\beta 3$ канавке димера В6 АКД консервативного фрагмента NTD в составе комплекса 14-3-3σ/pB6. Соответствующая разностная “omit” карта с разрешением 4,5 Å с контуром $2,5\sigma$ (зеленая сетка). Д. Крупный план взаимодействия консервативного фрагмента NTD (остатки 27-34) с $\beta 3/\beta 3$ канавкой АКД. Полупрозрачная поверхность димера АКД окрашена согласно значениям электростатического потенциала от -1 (красный) до +1 кТ/е (синий).

Кристаллическая структура комплекса 14-3-3σ/pB6 выявляет несколько функционально значимых областей B6 NTD (остатки 1-71). В частности, из трех комплексов, обнаруженных в асимметричной единице кристаллов (Рис. 41), карта электронной плотности 4,5 Å для одного комплекса позволяет отследить остатки с 1 по 38 в одном NTD и 1-20 в другом NTD, тогда как в двух других комплексах видны только остатки 1-20 и 27-38 в одном NTD и 1-20 – в другом NTD.

Во-первых, обе pSer16-содержащие области димера B6 связываются в соответствующих AB 14-3-3 (Рис. 42A), в конформации, практически идентичной конформации, наблюдаемой в комплексе 14-3-3 с фосфопептидами (Ca r.m.s.d. 0,15 Å для остатков 14-19). Таким образом, наблюдаемая структура показывает, что B6 полностью оккупирует димер 14-3-3, делая его недоступным для взаимодействия с другими фосфорилированными партнерами.

Во-вторых, мы смогли проследить N-концевые остатки 1-12 обеих цепей B6, которые имеют различные конформации (обозначены как тип I и II, см. Рис. 42). Интересно, что N-конец типа I занимает канавку β4/β8, расположенную на боку ближайшего АКД в пределах одного гетеротетрамера, тогда как цепь типа II участвует в аналогичном взаимодействии через контакт кристаллической решетки с соседним гетеротетрамером (Рис. 41 и Рис. 42). В обоих случаях остатки Val5 и Val7 N-концевого пептида встраиваются в гидрофобное ядро β4/β8 канавки B6 АКД (Рис. 42). Мы смогли получить независимое подтверждение этого контакта путем ко-кристаллизации B6 АКД (остатки с 72 по 149) с N-концевым пептидом B6, который соответствует остаткам 2-10 (EIPVPVQPS, N-пептид). В полученной кристаллической структуре с разрешением 2,6 Å упорядоченные пептиды занимают канавки β4/β8 с обеих сторон димера АКД (Рис. 42), полностью повторяя аналогичный интерфейс, наблюдаемый в полном комплексе 14-3-3σ/pB6 (Рис. 41). В других работах такое взаимодействие с β4/β8 канавками за счет гидрофобных остатков наблюдалось в основном для C-концевого PIV мотива [313, 317, 476, 478, 479], который присутствует в большинстве малых белков теплового шока человека, но отсутствует в B6. Наша структура показывает, что необычный N-концевой мотив ³IPVPV⁷ белка B6 [313] также способен на такое взаимодействие с АКД. Такое взаимодействие N-концевого пептида 2-10 с АКД возможно и в случае свободного димера B6, а в структуре комплекса 14-3-3σ/pB6 явно стабилизирует сборку и прилегание АКД к C-концевому торцу 14-3-3 (Рис. 42). Тем не менее, нам удалось получить комплекс 14-3-3σΔC с pB6, укороченным не только с C-, но и с N-конца (остатки 7-153), при этом такой комплекс кристаллизовался практически в тех же условиях, что и

вариант с интактным N-концом, давая похожие по форме кристаллы (пластинки). Несмотря на крайне низкое разрешение $\sim 7 \text{ \AA}$ у таких кристаллов, которое позволяло решить, но не давало возможности уточнить структуру, мы наблюдали очень сходные параметры кристаллической ячейки для усеченного (пространственная группа $C 2 2 2 1$, ячейка $a=130,2 \text{ \AA}$, $b=355,2 \text{ \AA}$, $c=148,9 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$) и для варианта с интактным N-концом (пространственная группа $C 2 2 2 1$, ячейка $a=125,1 \text{ \AA}$, $b=341,3 \text{ \AA}$, $c=144,6 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$). Принципиальное решение этой структуры было изофорным по отношению к варианту с интактным N-концом, что указывает на отсутствие строгой необходимости в блокировании гидрофобной бороздки $\beta 4/\beta 8$ N-концевым пептидом В6 для сборки асимметричной структуры комплекса, наблюдаемой в кристаллической структуре.

В-третьих, кристаллическая структура комплекса 14-3-3 σ /pВ6 позволяет проследить RLFQxFG мотив (остатки 27-34) N-концевого сегмента В6, который является единственным высоко консервативным участком в пределах NTD sHSP позвоночных и, предположительно, играет роль в образовании их гетеродимерных комплексов [480, 481]. Мы впервые обнаружили, что в цепи типа I этот мотив становится упорядоченным после попадания в особую канавку, расположенную между двумя $\beta 3$ складками в димере АКД (Рис. 42). Такое встраивание приводит к выгодному взаимодействию отрицательно заряженного остатка Asp30 с положительно заряженным дном канавки (Рис. 42). В канавке есть место только для одной копии такого мотива. Соответственно, в гетеротетрамере только один консервативный мотив NTD (в цепи типа I) находится в связанном состоянии, тогда как второй мотив (в цепи типа II) остается неупорядоченным, порождая асимметричность общей архитектуры. Проксимальная к АКД половина NTD (остатки 39-69) разупорядочена во всех цепях, оставляя неоднозначность во взаимосвязи N-концевых частей и АКД (см. Рис. 42). Позднее было показано сходное взаимодействие разупорядоченного фрагмента с $\beta 3/\beta 3$ бороздкой АКД в составе гетеротетрамера, образованного белками HSPB2 и HSPB3 [478].

Таким образом, гетеротетрамер 14-3-3 σ /pВ6 стабилизирован связыванием фосфопептидов В6 в АБ обеих субъединиц 14-3-3 σ , а также асимметричным примыканием АКД к С-концевым α -спиралям только одной из субъединиц 14-3-3. При образовании комплекса значительная часть В6 NTD упорядочивается, и отдельные его сегменты связываются в $\beta 4/\beta 8$ и $\beta 3/\beta 3$ канавках АКД, дополнительно стабилизируя сборку (Рис. 42). Такой мультиточечный характер взаимодействия согласуется с представлениями о том, что различные взаимодействия дают вклад в общее сродство полноразмерного pВ6 к 14-3-3, что мы наблюдали, сравнивая его аффинность с аффинностью синтетических фосфопептидов.

3.1.6. Анализ структуры комплекса белков 14-3-3 и HSPB6 в растворе

Получив кристаллическую структуру, мы провели всесторонний анализ структуры полного комплекса в растворе с помощью ограниченного трипсинолиза (Рис. 43), МУРР и дисульфидной сшивки (Рис. 44). Свободный рВ6 эффективно расщепляется трипсином по остаткам R13 и R14, но в комплексе с 14-3-3γ это расщепление происходит значительно медленнее (Рис. 43). Это согласуется с нашими структурными данными, так как остатки R13 и R14 защищены, будучи связанными в АБ в составе фосфопептидов (Рис. 42). Расщепление же по остаткам R27 и R32 происходит с почти одинаковой эффективностью как в свободном, так и в 14-3-3-связанном рВ6, хотя и с еще более медленной скоростью, чем расщепление по R13/R14 в составе комплекса с 14-3-3 (Рис. 43). Это означает, что остатки R27 и R32 достаточно защищены как в свободном димере В6, так и в комплексе, и косвенно подтверждает гипотезу о том, что консервативный пептид малых белков теплового шока 27-34 связывается в бороздке β3/β3, формируемой вблизи интерфейса димера АКД. Можно ожидать, что такое связывание каким-то образом влияет на способность димеров малых белков теплового шока обмениваться субъединицами.

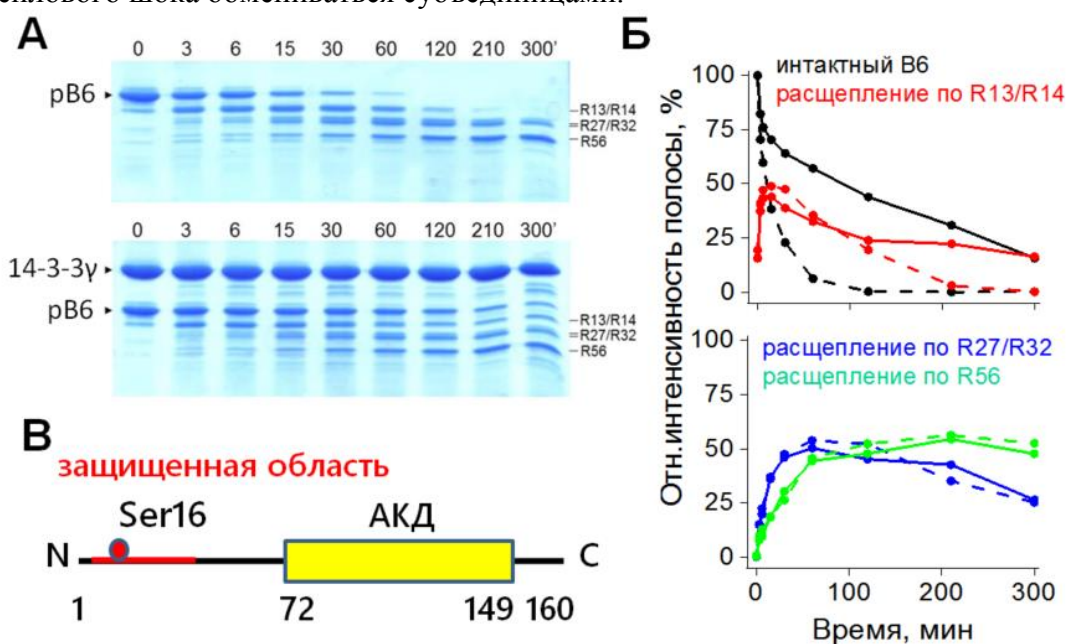


Рис. 43. Влияние 14-3-3γ на трипсинолиз рВ6. А. Кинетика (мин) переваривания рВ6 в отсутствие (сверху) или в присутствии 14-3-3γ (снизу) при весовом соотношении рВ6/трипсин 1500:1, по данным ДСН-электрофореза в 12-20% ПААГ. Основанная на масс-спектрометрии идентификация продуктов расщепления рВ6 по R13, R14, R27, R32 и R56 (соответствующие полосы отмечены справа). Расщепление 14-3-3γ в параллельном контрольном эксперименте было незначительным. Б. Кинетика трипсинолиза рВ6 (пунктир) или рВ6 в комплексе с 14-3-3γ (сплошные линии), показывающая изменение интенсивностей полос для интактного рВ6 и продуктов его расщепления в указанных местах во времени. Интенсивности полос выражены в % от интенсивности полосы интактного рВ6 в нулевое время. В. Схема, показывающая область вокруг Ser16, защищенную от протеолиза в комплексе с 14-3-3γ.

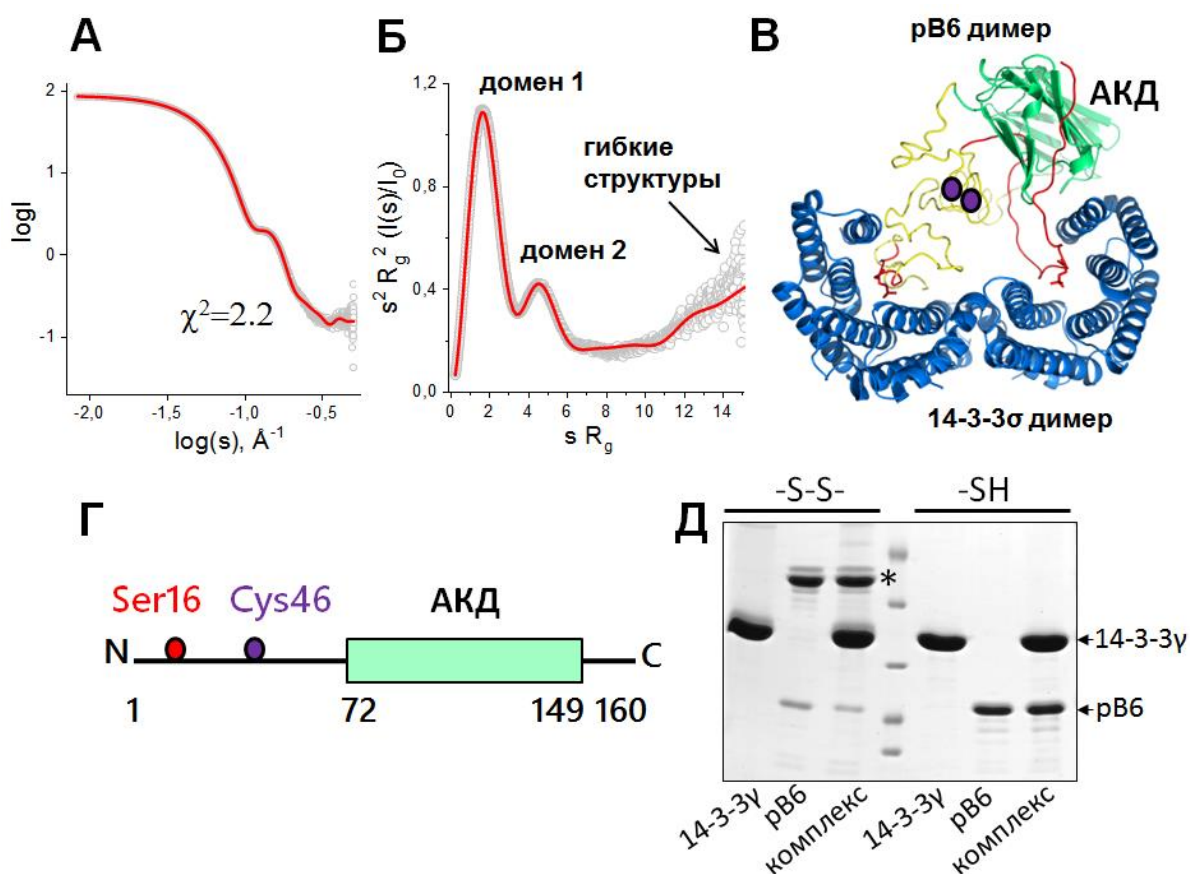


Рис. 44. Анализ структуры комплекса 14-3-3/pV6 в растворе. А. Кривая МУРР для комплекса 14-3-3 Δ C/pV6 Δ C (серые кружки), совмещенная с расчетной кривой рассеяния для полноатомной модели (красная линия). Б. Преобразование данных МУРР с помощью безразмерного графика Кратки, показывающее наличие частиц с двумя выраженными доменами и гибкими участками. В. Полноатомная модель гетеротетраммерного комплекса, включающая кристаллическую структуру (димер 14-3-3 σ синий, димер В6 АКД зеленый, упорядоченные части NTD красные), дополненный гибкими частями NTD (желтый) при моделировании в *CORAL* [414]. Фиолетовые кружки показывают примерное расположение остатков Cys46, допускающее образование дисульфидного моста. Г. Расположение единственного остатка Cys46 в первичной структуре В6. Д. Мягкое окисление при диализе (25 °С в течение ночи в буфере без восстановителей) приводит к эффективному «сшиванию» остатков Cys46 как в свободном В6, так и в составе комплекса с 14-3-3 γ (по 30 μ M каждого в пересчете на мономер). Положение полосы сшитого димера pV6 показано звездочкой, положения 14-3-3 γ и pV6 показаны стрелками справа. После восстановления образцов полосы «сшитых» димеров pV6 исчезают.

До 50% последовательности белка В6, приходящейся в основном на N- и С-концы, состоит из аминокислотных остатков, склонных к структурной разупорядоченности [313]. При образовании комплекса часть этих сегментов упорядочивается, однако сегменты 39-69 одной цепи и 21-69 второй цепи димера В6 отсутствуют в картах электронной плотности (Рис. 42). Для того чтобы изучить конформацию комплекса в растворе и построить ее полноразмерную модель, содержащую также эти сегменты, отсутствующие в

кристаллической структуре, мы использовали экспериментальные данные (МУРР) для комплекса 14-3-3 σ /pV6 Δ C в растворе (Рис. 44А). Безразмерный график Кратки, являющийся преобразованием данных МУРР (Рис. 44Б), показывает наличие двух ярко выраженных пиков, которые характерны для глобулярных белков или доменов, и небольшого подъема при более высоких значениях s , соответствующего наличию некоторого количества гибких элементов структуры. Такой вид графика однозначно говорит о том, что частицы комплекса 14-3-3 σ /pV6 являются довольно компактными и содержат два жестких структурных модуля (которые, предположительно, соответствуют димерам 14-3-3 и АКД), связанных более гибкими линкерами. Это очень хорошо согласуется с информацией, которая следует из кристаллической структуры, поэтому оправдывает моделирование отсутствующих сегментов В6 NTD (11% от общего количества остатков в комплексе) на основе экспериментальных данных МУРР. Эти сегменты были достроены на основе кристаллической структуры при помощи *CORAL* [414], итеративно, при пошаговой максимизации соответствия между экспериментальными данными и кривой МУРР, рассчитанной по полноатомной модели комплекса с помощью *CRY SOL* [416]. Такой анализ показал, что может быть получена модель, обеспечивающая хорошее описание экспериментальных данных при значении χ^2 равном 2,2 для всего диапазона данных рассеяния s (Рис. 44). Важно, что альтернативная симметричная модель, в которой АКД помещался в подходящий для него по размеру проем в структуре димера 14-3-3, крайне плохо описывала экспериментальные данные МУРР (Рис. 45).

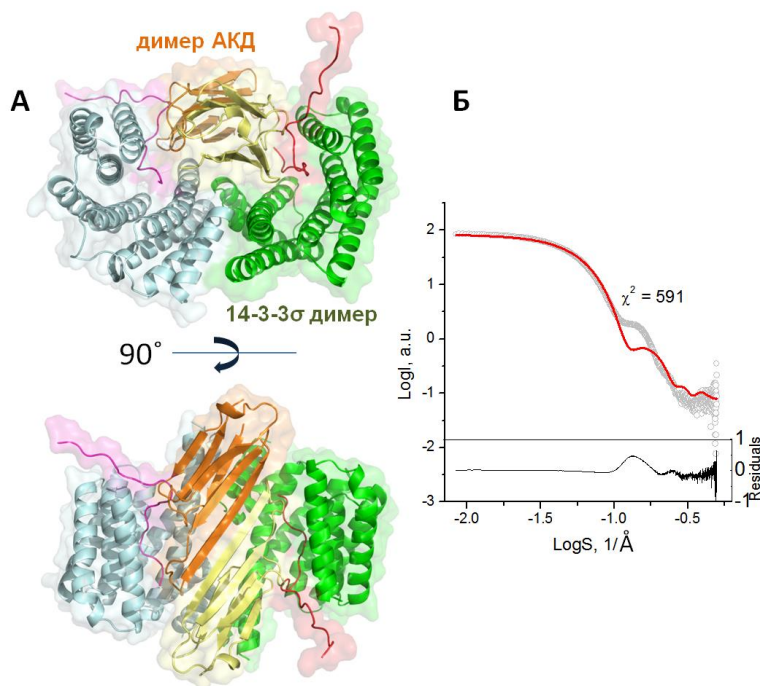


Рис. 45. Альтернативная симметричная и компактная модель структуры комплекса в растворе (А), полученная с помощью *CORAL* при фиксированном положении АКД в центральной полости 14-3-3, не соответствует экспериментальным данным МУРР (Б), несмотря на хорошее пространственное соответствие.

Сравнение моделей показывает, что кристаллографическая структура может быть реализована и в растворе, в результате чего оба NTD, будучи по своей природе динамичными, дают относительно компактные конформации и находятся в открытой полости, образованной взаимодействующими димерами 14-3-3 и АКД (Рис. 44В). При этом остатки Cys46 обеих цепей В6 могут находиться недалеко друг от друга (Рис. 44В). Поскольку в белке В6 отсутствуют другие остатки цистеина (Рис. 44Г), мы решили использовать эту особенность для дополнительной проверки модели, проведя окисление свободного и 14-3-3γ-связанного рВ6 при диализе против буфера, не содержащего восстановителей (Рис. 44Д). Оказалось, что происходит эффективное образование дисульфидного моста между остатками Cys46 в димере рВ6 как в свободном, так и в 14-3-3γ-связанном состоянии (Рис. 44Д), причем наличие 14-3-3 не снижает этой эффективности (Рис. 44Д). Эти данные указывают на то, что связывание 14-3-3 не влияет на расположение остатков Cys46 в димере рВ6. Существует вероятность, что при довольно длительном диализе происходит сшивание внутри только тех димеров рВ6, которые диссоциировали от 14-3-3, что в теории может постепенно приводить к полному распаду комплекса. Для того чтобы исключить такую вероятность, мы провели анализ свободных рВ6 и 14-3-3ζΔС и их комплекса до и после окислительного диализа с помощью МУРР (Рис. 46). Выбор изоформы 14-3-3 в данном случае не был принципиален. Мы обнаружили, что окисление и образование дисульфидного моста между остатками Cys46 не изменяет формы кривой МУРР (и размера соответствующих частиц) ни в одном случае. В свою очередь, это означает, что внутридимерная сшивка не влияет принципиально на конформацию рВ6 и не зависит от того, связан он с 14-3-3 или нет, косвенно подтверждая полученную нами структурную модель (Рис. 44В). Аналогично мы могли получить комплекс 14-3-3 с предокисленным рВ6.

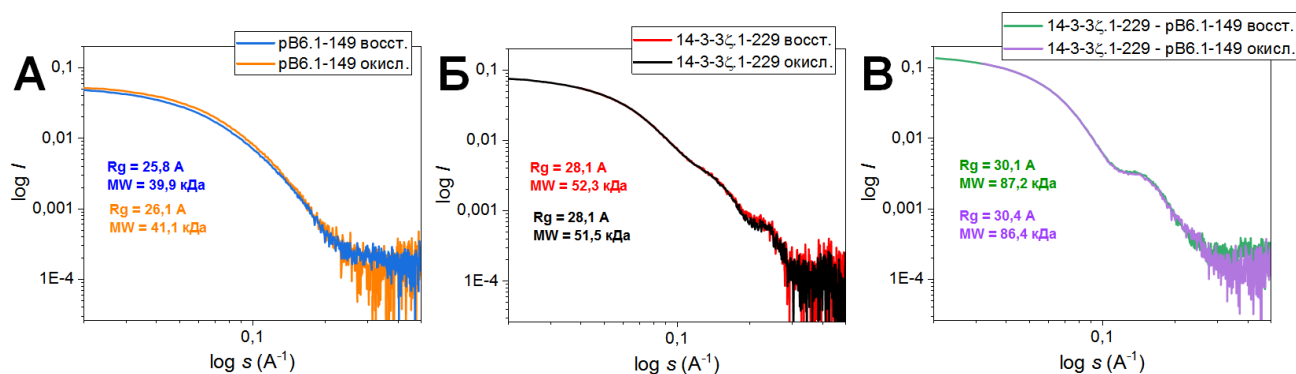


Рис. 46. Анализ рВ6 (А), 14-3-3ζΔС (Б) и их комплекса (В) в восстановленных и окисленных условиях с помощью МУРР. Показаны экспериментальные данные МУРР для препаратов, отдиализованных против двух буферов, один из которых содержал 5 мМ ДТТ, а другой не содержал восстановителей. Для каждого образца приведены значения R_g и массы частиц, полученные из экспериментальных кривых с помощью программного пакета ATASAS [414].

Таким образом, конформации типа той, что показана на Рис. 44В, могут существовать в растворе. Однако статистически не идеальное описание экспериментальных МУРР данных полученной моделью ($\chi^2 = 2,2$) может означать, что реальная структура более динамична. Например, нельзя исключить динамичную ассоциацию/диссоциацию АКД от 14-3-3 в составе комплекса с временной фиксацией его положения на С-концевых α -спиралях 14-3-3.

Для того чтобы выяснить, насколько прочен интерфейс 14-3-3/АКД сам по себе, мы получили высокоочищенный препарат, соответствующий В6 АКД (остатки 72-149), и проанализировали его прямое взаимодействие с 14-3-3 σ ДС методом гель-фильтрации (Рис. 47). Поскольку в отличие от 14-3-3, В6 АКД не содержит остатков триптофана, мы могли следить за возможным перераспределением пика 14-3-3 на профиле ГФ в канале триптофановой флуоресценции, не учитывая В6 АКД. Однако оказалось, что даже при высокой концентрации белков в смеси, профиль ГФ не позволяет обнаружить прочные комплексы 14-3-3 σ ДС с изолированным В6 АКД (Рис. 47). В первую очередь, это подчеркивает первичную роль фосфопептидов В6 в связывании с 14-3-3, а, во-вторых, может означать, что интерфейс 14-3-3/АКД достаточно нестабилен даже в составе полноразмерного комплекса. Кроме того, нельзя исключать, что вторичное связывание АКД с С-концевыми α -спиралями 14-3-3 происходит только после связывания фосфопептидов В6 в АБ 14-3-3, что приводит к закрытию конформации димера 14-3-3 (как показано на Рис. 37) и образованию более жесткой площадки для посадки АКД. В любом случае, фиксация АКД на поверхности 14-3-3 может стабилизироваться оккупированием β 4/ β 8 бороздки В6 АКД его N-концевым пептидом (2-10) (Рис. 42).

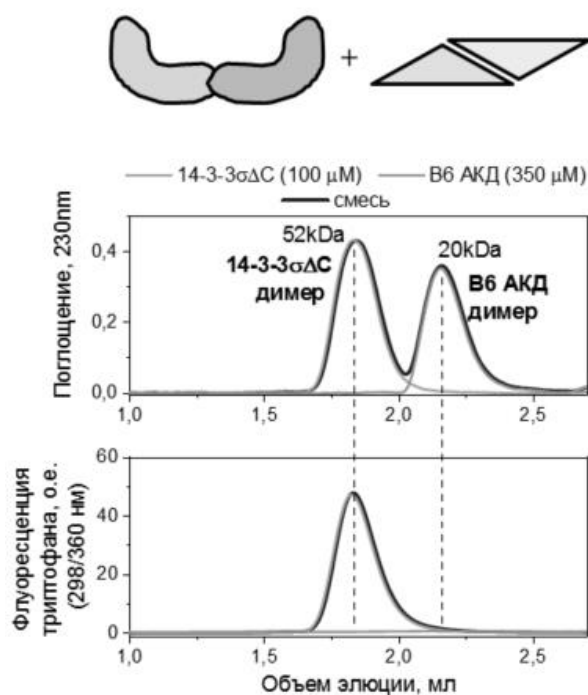


Рис. 47. Изолированный α -кристаллиновый домен В6 (В6 АКД) не способен образовывать прочный комплекс с 14-3-3 σ ДС. Сверху представлена схема эксперимента, который показан внизу. Два белка отдельно или в смеси в указанных концентрациях были нанесены на колонку Superdex 200 Increase 5/150. Профили элюции получали при регистрации поглощения при 230 нм и триптофановой флуоресценции (возбуждение 298 нм, эмиссия 360 нм). В6 АКД не содержит остатков триптофана, поэтому в отличие от 14-3-3 его не видно на нижнем профиле. Кажущиеся массы белков были определены при калибровке колонки с помощью белков-стандартов и указаны над пиками.

3.1.7. Этапы сборки комплекса 14-3-3/HSPB6 и возможности для создания лекарственных препаратов, влияющих на эти процессы

Таким образом, мы установили молекулярный механизм взаимодействия 14-3-3 с pB6, включающий несколько этапов (Рис. 48). Мы предполагаем, что этот процесс начинается с взаимодействия одного фосфопептидного сегмента димера B6 с одной из AB димера 14-3-3. Это значительно облегчает прикрепление второго фосфопептидного сегмента, что приводит к синергичному связыванию с двойной фиксацией. В результате оба участка связывания в димере 14-3-3 оказываются задействованными, что делает его недоступным для других взаимодействий с белками-партнерами, в то время как гибкие NTD, вероятно, все еще оставляют значительную свободу димеру АКД. Будучи заякоренным за счет связывания фосфопептидов, димер АКД закрепляется на двух С-концевых α -спиралях одной субъединицы 14-3-3, что нарушает двойную симметрию комплекса. Примечательно, что одновременное связывание димера АКД к обеим субъединицам 14-3-3 через упомянутый интерфейс невозможно стереохимически (см. Рис. 42). Вновь образованный комплекс, по всей видимости, является относительно жестким и способствует дальнейшему упорядочиванию NTD сегментов B6, которые заключены в полости, образованной доменами 14-3-3 и АКД. В результате такого мультиточечного взаимодействия и синергии кажущаяся константа диссоциации комплекса оказывается значительно ниже, чем соответствующая константа диссоциации комплекса 14-3-3 с фосфопептидами.

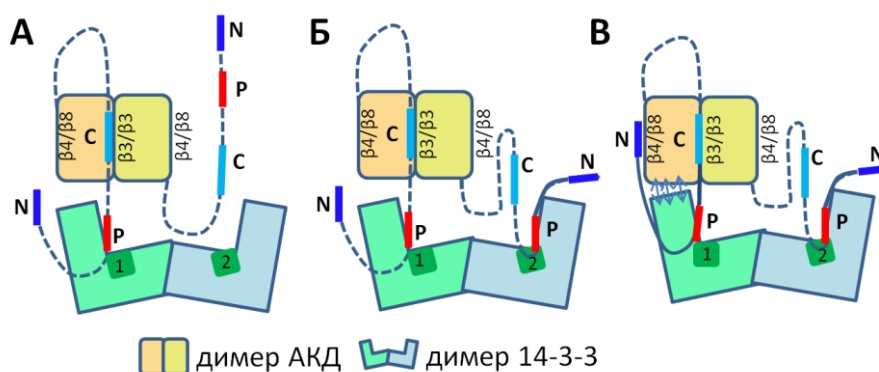


Рис. 48. Предполагаемый механизм формирования регуляторного комплекса 14-3-3/pB6. Ключевые области NTD белка B6 обозначены следующим образом: N, N-концевая область (остатки 1-10); P, 14-3-3-связывающая область (остатки 13-20), включающая pSer16; C, «центральный» консервативный регион (остатки 27-34). Одна из двух центральных областей «С» может занимать $\beta 3/\beta 3$ -канавку димера АКД уже в свободном состоянии. А. Первый фосфомотив димера pB6 связывается в канавке одной субъединицы 14-3-3. Б. Второй фосфомотив связывается с другой субъединицей 14-3-3. В. Димер АКД закрепляется на С-концевой доле проксимальной субъединицы 14-3-3 (двухсторонние стрелки), что в итоге вызывает структурирование дополнительных N-концевых остатков задействованной цепи pB6 (сплошные линии). Второй NTD размещается в сформированной полости и, вероятно, также частично упорядочен. Взаимодействие АКД с 14-3-3 является динамичным.

Данные литературы указывают на то, что структурно-разупорядоченные сегменты (intrinsically disordered regions, IDR) играют критическую роль в белок-белковых взаимодействиях, часто действуя через механизм, зависящий от фосфорилирования [482-485]. Взаимодействие между 14-3-3 и фосфорилированным В6, участвующим в регуляции расслабления гладких мышц, является ярким примером этой функциональной парадигмы.

Учитывая высокие внутриклеточные концентрации В6 (~ 1% растворимого белка в мышцах [300]), его сильное сродство к 14-3-3 (Рис. 38) подразумевает, что, будучи фосфорилированным, В6 может вытеснять другие белки-партнеры 14-3-3, модулируя интерактом последних [250, 335]. Похожий механизм был предложен ранее для другого белка-партнера 14-3-3, белка промежуточных филаментов виментина, который представлен в клетке в высоких концентрациях и может доминировать в комплексах 14-3-3 при разборке промежуточных филаментов в ответ на фосфорилирование [205].

Проведенная структурная характеристика комплекса 14-3-3/pВ6 дает беспрецедентный пласт структурной информации для малых белков теплового шока (sHSP) млекопитающих. Действительно, в комплексе нам удалось отследить конформацию 38 аминокислотных остатков в NTD В6 человека, что соответствует более чем половине длины NTD. N-концевой домен, который в значительной степени разупорядочен в В6 и других малых белках теплового шока в свободном состоянии [313, 486], играет существенную роль как в их шаперонной функции, так и в олигомеризации, типичной для большинства малых белков теплового шока [448, 480, 487, 488].

Упорядочивание NTD в комплексе 14-3-3/pВ6 следует принципу фолдинга, индуцированного связыванием, что, по-видимому, является общей особенностью, наблюдаемой при взаимодействии IDR-содержащих белков с их партнерами [489]. В результате IDR могут выступать в роли «молекулярных реостатов», пластично меняя свою структуру в зависимости от конкретного партнера [484, 490]. Вероятно, эта особенность также применима к шаперонной функции sHSP. Наличие асимметрии комплекса 14-3-3/pВ6 также означает, что NTD белка В6 способны принимать различные конформации даже при взаимодействии с одним и тем же партнером (в данном случае, две эквивалентные субъединицы 14-3-3), представляя собой интересный случай универсальности и пластичности IDR. Такое поведение, по-видимому, является общей темой у sHSP, поскольку недавно было показано, что крупные олигомеры α В-кристаллина человека включают две различные конформации его NTD [491], хотя аналогичная неэквивалентность NTD также была наблюдается у sHSP дрожжей [492] и растений [493].

Очевидно, особое значение имеет наблюдаемое в структуре связывание высококонсервативного N-концевого мотива RLFQxFG в бороздке $\beta 3/\beta 3$ димера АКД (Рис. 42). Мы предполагаем, что это взаимодействие является неотъемлемой особенностью, определяющей стабильность димера В6 и, скорее всего, других sHSP млекопитающих. Это согласуется с данными о влиянии этого консервативного мотива на функциональные свойства белка HSPB6 [480] и его способности гетеродимеризоваться с HSPB1 [481, 494]. Уместно отметить, что недавно было показано взаимодействие малых молекул с терапевтическим потенциалом с той же бороздкой $\beta 3/\beta 3$ в α -кристаллинах [495]. Такое связывание приводит к стабилизации α -кристаллина и, в конечном итоге, помогает предотвратить его агрегацию, открывая перспективы лечения катаракты глаза.

Скорее всего, наличие протяженных IDR во всех sHSP млекопитающих [313, 478] является главной причиной, по которой ни один из них не мог быть кристаллизован в виде полноразмерного белка. По счастливой случайности, образование комплекса с 14-3-3 приводит к частичному упорядочиванию NTD внутри полости, образованной димером 14-3-3 и асимметрично связанным димером АКД. Такого упорядочивания, по-видимому, оказалось ровно достаточно для образования кристаллов, что позволило нам разрешить эту давнюю загадку. Установленная структура стала первой структурой какого-либо малого белка теплового шока в функциональном состоянии и одновременно второй структурой какого-либо комплекса 14-3-3 (после структуры с AANAT, опубликованной 16 годами ранее [163]).

Располагая полной моделью комплекса, мы проанализировали применимость структуры для разработки низкомолекулярных модуляторов с помощью *PockDrug* [496] (Рис. 49). Такой анализ выявил два кармана в АБ 14-3-3, расположенные вблизи остатков 13-14 и 17-20 фосфопептида В6, соответственно, а также третий карман – в относительно рыхлом интерфейсе 14-3-3/АКД (Рис. 49 и Табл. 22). Ввиду участия комплекса в регуляции расслабления гладких мышц [4, 250, 323, 325, 326, 331, 340, 344, 447], эти результаты открывают перспективу рационального дизайна новых миорелаксантов. Во-первых, наши структурные данные позволяют оптимизировать небольшие молекулы, которые непосредственно имитируют связывание pВ6 с 14-3-3 [339], но не имеют ограничений, которые характерны для кандидатов на основе пептидов, таких как AZX100® [343]. Во-вторых, представляется перспективным разработать соединения, которые будут модулировать взаимодействие 14-3-3 с эндогенным pВ6, а не полностью блокировать АБ 14-3-3, которая участвует в связывании большого числа разных лигандов. Сильной стороной этого подхода является его селективность по отношению к комплексу 14-3-3 именно с pВ6.

Подобная стабилизация специфического комплекса 14-3-3 была показана недавно для взаимодействия между 14-3-3 и белком Gab2 [497], причем низкомолекулярный стабилизатор связывался с карманом 1, показанным на Рис. 49.

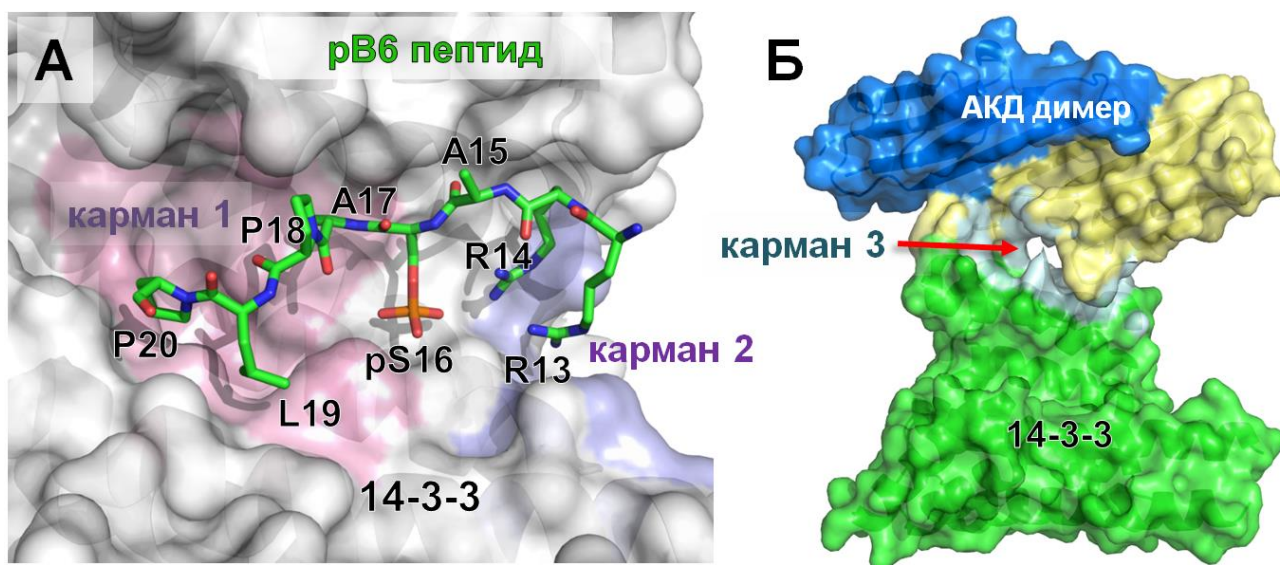


Рис. 49. Потенциальные «карманы» для связывания модуляторов комплекса 14-3-3σ/pV6. А. Интерфейс в АБ 14-3-3σ оставляет два кармана (окрашены в розовый и фиолетовый цвета) на каждом конце связанного фосфопептида (зеленый), из которых по количественным характеристикам карман 1 особенно перспективен. Б. Еще один карман (карман 3, голубой) находится в интерфейсе 14-3-3σ/В6 АКД.

Табл. 22. Параметры карманов, обнаруженных в структуре комплекса 14-3-3σ/pV6 с помощью сервера *PockDrug* [496].

карман	объем	гидро-фобность	Кол-во остатков	полярные	ароматические	Применимость для подбора модуляторов*
1	903,9 Å ³	-0,24	17	0,41	0,18	0,78 ±0,07
2	344,4 Å ³	-0,99	9	0,67	0,11	0,21 ±0,01
3	1990,3 Å ³	-0,55	27	0,52	0,15	0,65 ±0,04

*более высокое значение говорит о большей перспективности.

Поскольку в АБ 14-3-3 связывается большое количество разных фосфопептидов [81, 153], существует некоторая проблема при ее использовании для подбора лекарств, поскольку в данном случае может быть весьма сложно подобрать селективный модулятор тех или иных взаимодействий, не влияющий на остальные взаимодействия. Для этого необходимо как можно более полно понимать взаимодействие 14-3-3 с разными фосфопептидами. Однако к

настоящему моменту количество известных структур 14-3-3 с различающимися фосфопептидами значительно уступает количеству известных комплексов 14-3-3 (см. Табл. б), что делает целесообразным новые исследования, в том числе в высокопоточном формате [80]. Хотя структурные исследования комплексов 14-3-3 с фосфопептидами в настоящее время активно продолжаются [3, 144, 149, 157, 162, 169], наиболее перспективным представляется использование *вторичных* взаимодействий в комплексах 14-3-3 за пределами АБ, ввиду потенциально большей избирательности такой модуляции (Рис. 50).

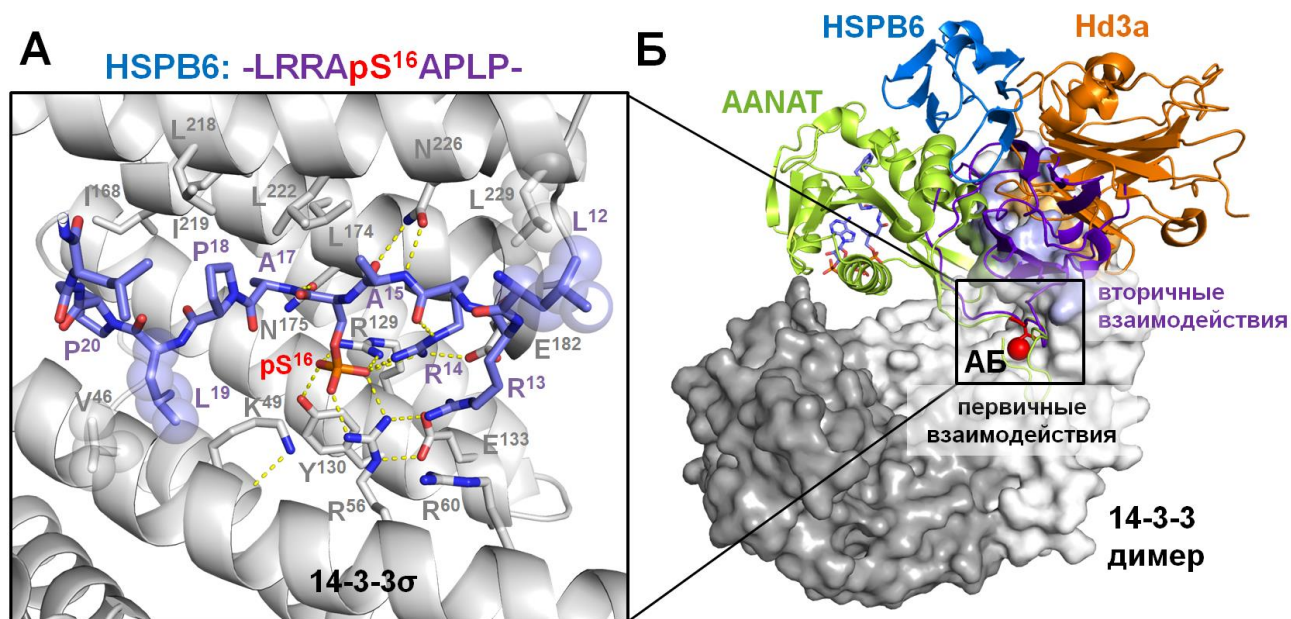


Рис. 50. Первичные и вторичные взаимодействия 14-3-3 с белками-партнерами. А. Первичное связывание фосфопептида HSPB6 в амфипатической бороздке (АБ) 14-3-3σ (код PDB 5LTW). Б. Расположение доменов некоторых белков-партнеров при их ассоциации с димером 14-3-3. Димер 14-3-3 представлен поверхностью с субъединицами белого и серого цвета. 14-3-3-связанные AANAT (код PDB 1IB1), Hd3a (код PDB 3AXY) и HSPB6 (код PDB 5LTW) показаны зелеными, оранжевыми и сине-фиолетовыми лентами, соответственно. Фосфорилированный остаток, связанный в одном из участков АБ 14-3-3, показан красной сферой, области вторичных взаимодействий, где партнеры контактируют с димером 14-3-3 за пределами АБ, окрашены зеленым (AANAT), бежевым (Hd3a) и фиолетовым (HSPB6).

В свете этого мы попробовали использовать 14-3-3/АКД интерфейс для виртуального скрининга низкомолекулярных соединений, обладающих сродством к карману 3 (Рис. 49) с помощью платформы *MCULE* (<https://mcule.com>). Поиск проводили с использованием параметров по умолчанию и автоматического докинга соединений из обширной библиотеки, состоящей из более 5 млн различных химических веществ, синтез которых доступен для заказа. Оказалось, что многие соединения демонстрируют способность связываться в кармане 3 – примеры четырех таких соединений приведены на Рис. 51.

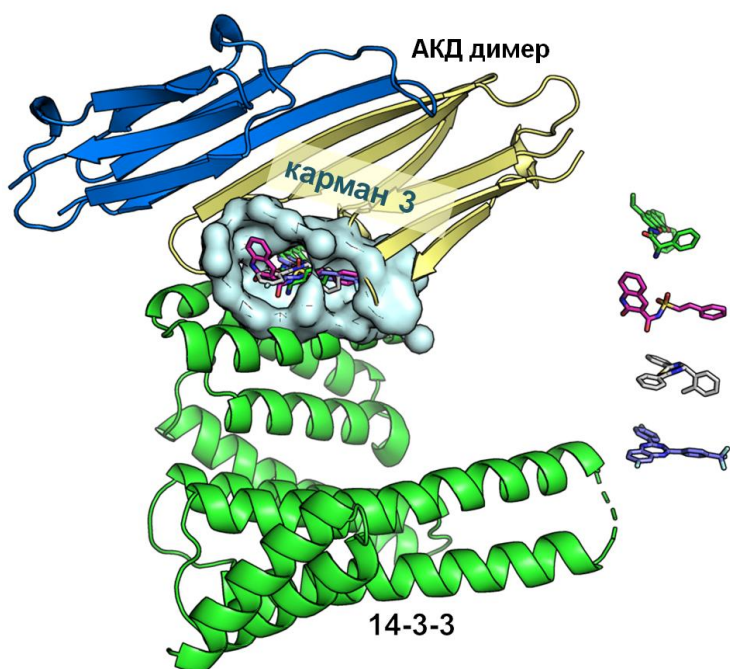


Рис. 51. Примеры соединений, имеющих сродство к карману 3, сформированному интерфейсом 14-3-3/АКД, по данным виртуального скрининга с помощью платформы *MCULE*. Для наглядности соединения в связанной конфигурации вынесены направо. Идентификаторы соединений в базе *MCULE* приведены сверху вниз – **1087138745** (зеленый), **1223207753** (пурпурный), **7820522590** (серый), **8358256254** (фиолетовый).

3.2. Разработка и применение методов, облегчающих структурные исследования комплексов 14-3-3

3.2.1. Получение фосфорилированных белков при ко-экспрессии с РКА

Как было сказано выше, исследования комплексов 14-3-3 с фосфорилированными белками-партнерами затруднены из-за сложности *стехиометрического* фосфорилирования 14-3-3-связывающих сайтов, а также их преимущественным расположением в протяженных неструктурированных областях (IDR) [161, 271, 498-501]. В результате, на фоне огромного числа установленных ББВ с участием 14-3-3, количество известных структур комплексов 14-3-3 с фосфопептидами крайне ограничено, а успешно решенные структуры полных белок-белковых комплексов вообще единичны (см. Табл. 6) [80]. Ввиду этого, представлялось целесообразным разработать новые подходы, которые облегчали бы такие исследования.

Было отмечено, что при получении структуры комплекса 14-3-3/pB6 мы использовали препарат B6, фосфорилированный по Ser16 при ко-экспрессии с РКА в *E.coli*, а затем очищенный без использования тагов (Рис. 39). Такой подход облегчался тем, что белок B6 экспрессируется в больших количествах и обладает хорошей растворимостью, а также отличается несложным и эффективным способом очистки [308].

3.2.1.1. Подбор компонентов системы ко-экспрессии на примере белка Тау

Для того чтобы сделать процедуру более удобной и универсальной, мы оптимизировали систему ко-экспрессии белка-партнера 14-3-3 с протеинкиназой, используя для этого другой партнер – белок Тау человека (Рис. 52). Этот белок взаимодействует с тубулином [502], регулирует сборку и стабильность микротрубочек аксонов и аксональный транспорт [503, 504], подвергается множественному фосфорилированию различными протеинкиназами и связан с развитием болезни Альцгеймера [185, 505-507]. Несмотря на хорошую растворимость и термостабильность, облегчающие очистку, экспрессия Тау в клетках *E.coli* приводит к получению небольших количеств белка [167, 248].

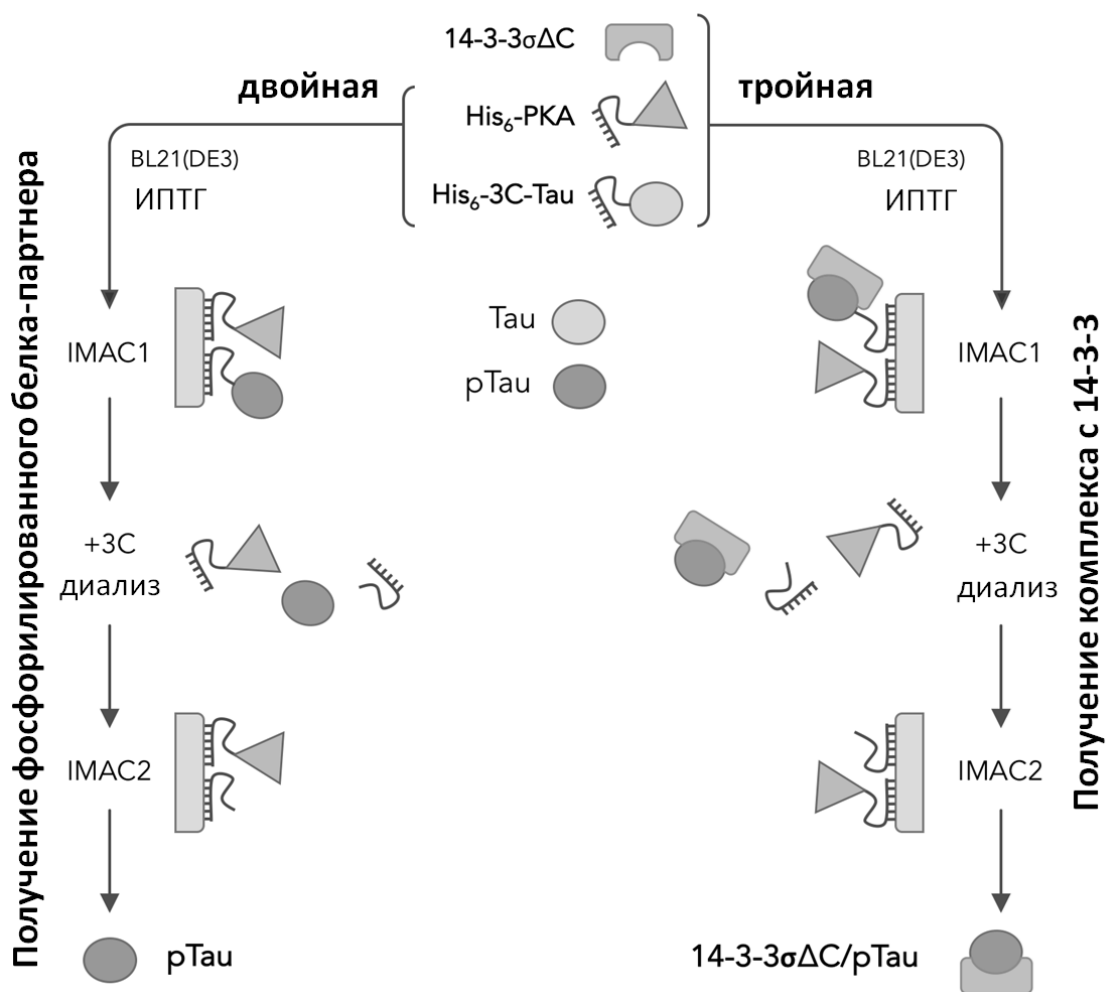


Рис. 52. Система ко-экспрессии для получения фосфорилированного белка (двойная, слева) или его комплекса с 14-3-3 (тройная, справа). Показано на примере Тау белка человека. Прямоугольником отмечен 14-3-3, треугольником – PKA, овалом – Тау (светлый и темный овал – нефосфорилированный и фосфорилированный Тау, соответственно). His-таг на PKA и Тау показан короткими гребенками. IMAC обозначает металлоаффинную хроматографию. 3C протеаза удаляется во время IMAC2, поскольку содержит неотщепляемый His-таг.

Чтобы создать гибкую и удобную систему ко-экспрессии для исследований взаимодействия 14-3-3 с различными фосфорилированными белками-партнерами, все три компонента (протеинкиназа, 14-3-3 и белок-партнер) должны были быть тщательно спроектированы. В такой системе Тау белок должен был содержать на N-конце гексагистидиновый таг, отщепляемый специфичной 3С протеазой, для его удобного получения в фосфорилированной форме в отсутствие (двойная ко-экспрессия с протеинкиназой) или в присутствии 14-3-3 (тройная ко-экспрессия) (Рис. 52). Система основывалась на модульном принципе, при котором все три участника – РКА, 14-3-3 и белок-партнер – были кодированы отдельными плазмидами, совместимыми по сайтам начала репликации и устойчивости к антибиотикам, и могли быть с легкостью заменены на другие подобные элементы (другой белок-партнер, другая киназа или другая изоформа 14-3-3) (Табл. 23).

Табл. 23. Компоненты системы ко-экспрессии.

Компонент	14-3-3	Протеинкиназа	Белок Тау
Описание	14-3-3 σ человека лишенная С-концевого гибкого пептида (остатки 232-248)	Каталитически активная субъединица РКА мыши	Зародышевая изоформа Тау белка человека
Вектор положение вставки	CDFduet-1 MCS2 (<i>NdeI/XhoI</i>)	pACYCduet-1 MCS1 (<i>NcoI/BamHI</i>)	pET28-His-3C (<i>NdeI/XhoI</i>)
Ориджин репликации	CDF	P15A	pBR322
Устойчивость к антибиотику	Стрептомицин	Хлорамфеникол	Канамицин
Таг	нет	His ₆	His ₆
Протеаза для отщепления тага	–	Тромбин	3С*
Расчетная масса, кДа	26,1	44,9	38,9 (36,8)**

*Была использована протеаза His₆-МВР-3С (69,7 кДа), подходящая для вычитающей металлоаффинной хроматографии (ИМАС). **Без His-тага. Электрофоретическая подвижность Тау соответствует 48-52 кДа и зависит от статуса его фосфорилирования.

Выбор протеинкиназы. Известно, что протеинкиназа А (РКА) часто функционирует в паре с 14-3-3, поскольку она фосфорилирует целевые белки в последовательностях

(R/K)RX(S/T) (где X – любая аминокислота) [508, 509], которые одновременно являются частью консенсусных мотивов (R/K)X₂₋₃(pS/pT)X(P/G) для связывания 14-3-3 [34]. Из-за такого перекрытия фосфорилирование РКА часто «подготавливает» белки-мишени для связывания 14-3-3. Более того, ранее описанная экспрессия растворимой активной каталитической субъединицы РКА в клетках *E.coli* [308, 510] делает эту киназу надежным и удобным инструментом фосфорилирования для белковой инженерии, и уже была удачно применена нами при получении фосфорилированного белка В6.

Конструкция Тау. Для системы ко-экспрессии мы выбирали широко известный белок-партнер 14-3-3, который фосфорилируется РКА и может быть получен в клетках *E.coli* в растворимой форме. Белок Тау отвечает всем этим критериям, поскольку он (i) является «хорошим» субстратом для РКА [511], (ii) хорошо известным партнером 14-3-3 [167, 186, 247, 248, 512, 513], а также (iii) растворим при бактериальной экспрессии. Была использована зародышевая изоформа Тау человека (352 остатка), содержащая несколько потенциальных сайтов связывания 14-3-3 [167].

Конструкция 14-3-3. РКА может фосфорилировать не только мишени 14-3-3, но и некоторые изоформы самих белков 14-3-3. Как отмечалось, основным участком фосфорилирования 14-3-3 является полуконсервативный остаток Ser58 (RXXS⁵⁸W, нумерация 14-3-3ζ изоформы), расположенный в интерфейсе 14-3-3, фосфорилирование которого провоцирует диссоциацию димеров 14-3-3 [117, 119, 216, 217]. Хотя уровень фосфорилирования 14-3-3 димеров невысок [132, 514], в ко-экспрессии необходимо было использовать изоформу 14-3-3, устойчивую к фосфорилированию под действием РКА. К счастью, некоторые изоформы 14-3-3, включая 14-3-3τ и 14-3-3σ, содержат естественную замену S → A в положении 58 и, следовательно, являются хорошими кандидатами. Несмотря на то, что 14-3-3τ, по-видимому, более распространена в головном мозге [515], 14-3-3σ в нем также экспрессируется [84, 516]. В пользу 14-3-3σ говорила лучшая кристаллизуемость, что было важно ввиду необходимости применения системы ко-экспрессии для структурной биологии. Поскольку изоформы 14-3-3 имеют консервативный фолд [113] и перекрывающийся интерактом [499, 500], использование технически более выигрышной 14-3-3σ представлялось оправданным. В настоящее время роль гибкого С-концевого пептида 14-3-3 до конца не ясна. Поскольку его отсутствие в конструкциях 14-3-3 не препятствует связыванию фосфорилированных белков-партнеров и пептидов [169, 513], а его присутствие может мешать кристаллизации белка и частично ингибировать взаимодействия с лигандами [130, 288], для ко-экспрессии мы использовали σ изоформу без С-конца (14-3-3σΔC). Эта

конструкция была успешно использована в получении структур комплексов 14-3-3 с pB6 (см. выше) и другими белками-партнерами в работах других авторов [169, 513].

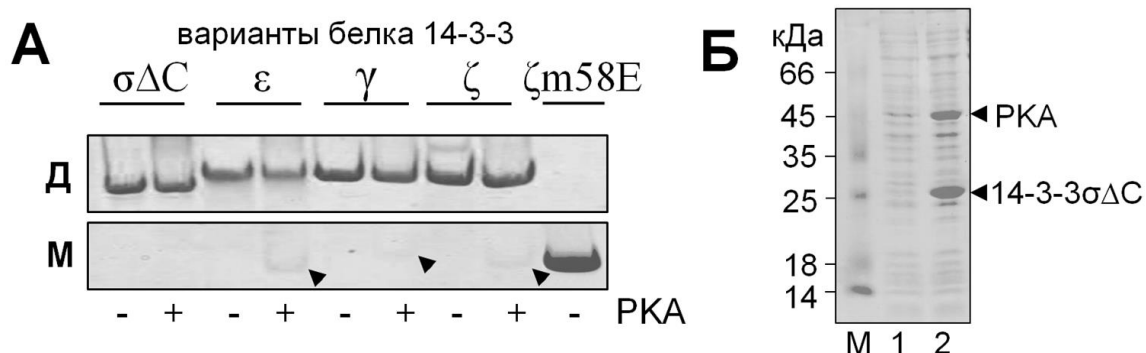


Рис. 53. Выбор варианта 14-3-3 для ко-экспрессии с РКА. А. Анализ результатов фосфорилирования различных 14-3-3 вариантов в отсутствие («-» дорожки) или в присутствии («+» дорожки) РКА с помощью нативного гель-электрофореза в 15% ПААГ, показанном отдельно для областей, содержащих димеры («Д») и мономеры («М»). Мономеры, образованные в случае ϵ , γ и ζ изоформ, отмечены стрелками. В качестве контроля использовали мономерный мутант 14-3-3 ζ m58E (см. ниже). Б. Тестовая экспрессия 14-3-3 $\sigma\Delta C$ и РКА в клетках BL21(DE3) по данным ДСН-электрофореза. М – стандарты молекулярной массы. 1 и 2 соответствует пробам до и после индукции ИПТГ.

Мы провели *in vitro* фосфорилирование четырех вариантов 14-3-3 (ϵ , γ , ζ и $\sigma\Delta C$) в присутствии большой концентрации РКА, чтобы преувеличить возможные последствия фосфорилирования при длительной ко-экспрессии с РКА, и проанализировали результаты методом нативного гель-электрофореза. Мы обнаружили, что ϵ , γ и ζ изоформы демонстрируют различную степень мономеризации белка, индуцированной фосфорилированием (Рис. 53А), что отражает присутствие фосфорилируемого остатка Ser58 в димерном интерфейсе всех этих изоформ. Хотя уровень мономеров был невысоким, использование любого из этих вариантов для совместной экспрессии с РКА могло оказаться неоптимальным. В тех же условиях вариант 14-3-3 $\sigma\Delta C$ был устойчив к мономеризации, индуцированной фосфорилированием (Рис. 53А), и поэтому подходил для ко-экспрессии с РКА. Действительно, ко-трансформация и ко-экспрессия CDF-14-3-3 $\sigma\Delta C$ и pACYC-РКА выявили индуцированную экспрессию основных полос ~26 кДа и ~45 кДа, соответствующих этим белкам (Рис. 53Б), однако, мы не смогли обнаружить какого либо значительного фосфорилирования 14-3-3 $\sigma\Delta C$ (данные не показаны). Таким образом, были получены компетентные клетки, экспрессирующие РКА/14-3-3 $\sigma\Delta C$, которые можно использовать для трансформации плазмидой, кодирующей произвольный белок-партнер 14-3-3.

Выбор векторов. Мы выбрали векторы с совместимыми точками начала репликации, которые также позволяли проводить независимую селекцию устойчивости к различным антибиотикам (Табл. 23). Система является очень гибкой и, в принципе, позволяет комбинировать практически любую желаемую мишень 14-3-3 с клетками, экспрессирующими РКА и 14-3-3, при условии, что соответствующий вектор совместим с таковыми для 14-3-3 и РКА (Табл. 23). Например, наиболее распространенные вектора pBR322, обеспечивающие устойчивость к канамицину или ампициллину, являются совместимыми. Для удобства анализа результатов экспрессии и последующих исследований электрофоретическая подвижность белка-партнера 14-3-3 должна отличаться от 26 или 45 кДа. В простейшем случае предполагалось, что интересующий белок-партнер (мишень РКА) будет клонирован в тот же вектор pET28-His-3С, который использовался для Тау.

Для эффективной очистки комплексов 14-3-3 мы использовали отщепляемые гексагистидиновые таги на N-концах РКА и мишени 14-3-3, отличающиеся ферментами, используемыми для отщепления тагов (Табл. 23). Важно, что 14-3-3 не содержал His-тага и, следовательно, не взаимодействовал с сорбентом самостоятельно, а только в случае образования комплекса с белком-партнером, несущим таг. Все компоненты имели разные теоретические массы, что делало их легко идентифицируемыми при ДСН-электрофорезе. В общем виде, отщепляемый His-таг должен присутствовать на наименее распространенном компоненте комплекса (либо на 14-3-3, либо на его белке-партнере), чтобы обеспечить правильную стехиометрию комплекса и его эффективное разделение при металлоаффинной хроматографии (ИМАС).

3.2.1.2. Двойная ко-экспрессия Тау с РКА

Фосфорилирование Тау при ко-экспрессии с РКА. Совместная трансформация компетентных клеток штамма BL21(DE3) совместимыми плазмидами, кодирующими Тау и РКА, или трансформация компетентных клеток BL21(DE3), уже несущих плазмиду РКА (Рис. 52, слева), при добавлении ИПТГ приводила к видимой индукции белковых полос с кажущейся молекулярной массой ~45 кДа и ~52 кДа (Рис. 54А). Так как Тау является структурно-разупорядоченным белком (IDP) [517, 518], схемы его очистки часто включают тепловую обработку [504]. В нашем случае Тау, ко-экспрессированный с РКА, оставался в супернатанте даже после 15-минутного кипячения клеточного лизата, что помогло однозначно идентифицировать его полосу (Рис. 54А). Полоса РКА (~45 кДа) исчезала после термической обработки из-за термолабильности киназы. После обработки фосфатазой

электрофоретическая подвижность Тау заметно возростала (Рис. 54Б), что характерно для Тау, дефосфорилированного по С-концевым остаткам Ser320 и Ser327 [511]. Это подтверждало, что Тау был фосфорилирован под действием РКА в бактериях. После отщепления гис-тага 3С протеазой, что сопровождалось смещением подвижности при ДСН-электрофорезе (Рис. 54А, дорожки 7 и 8), и повторном нанесении на колонку Ni-сефарозы, в конечном счете был получен высокоочищенный препарат фосфорилированного Тау («рТау^{coex}») (Рис. 54А). Интересно, что при низких концентрациях имидазола Тау связывался с Ni-сефарозой, скорее всего, из-за необычно высокого уровня положительно заряженных остатков в его последовательности и, в частности, 11 эндогенных остатков гистидина.

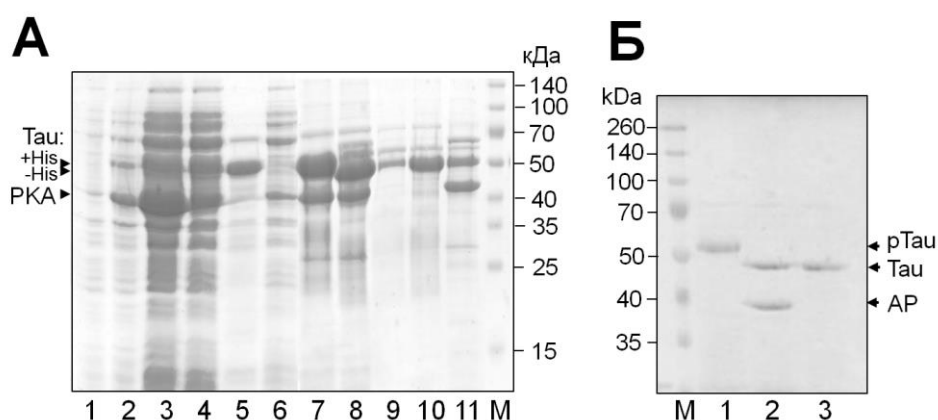


Рис. 54. Получение фосфорилированного Тау при ко-экспрессии с РКА. А. Пошаговая процедура экспрессии и очистки белка. Неиндуцированный (1) или ИПТГ-индуцированный образец (2), общая (3) и растворимая (4) фракции, термически обработанный (15 мин при 90 °С) и центрифугированный лизат (5), проскок (6) и элюат при ИМАС1 (7). Фракция, обработанная 3С (8), после нанесения и промывки при ИМАС2 10 мМ (9) или 20 мМ имидазолом (10) и фракция элюата при 500 мМ имидазола (11). Б. Очищенный рТау после ко-экспрессии с РКА (1) дефосфорилировали (2) с помощью фосфатазы (АР). Дефосфорилированный Тау отделяли от АР путем термической обработки в течение 15 мин при 90 °С (3). М – стандарты молекулярной массы (указаны в кДа). Положения белков показаны стрелками.

Известно, что Тау гиперфосфорилируется в головном мозге пациентов с различными тауопатиями, и паттерны фосфорилирования могут быть очень сложными [503, 506, 507]. Среди различных киназ, способных фосфорилировать Тау, РКА фосфорилирует *in vitro* по меньшей мере пять остатков в зародышевой изоформе Тау, а именно: Ser156, Ser235, Ser267, Ser320 и Ser327 [511]. Однако было установлено, что степень фосфорилирования составляет менее 2,5 [248, 511]. По данным наших более ранних исследований, остатки Ser156, Ser235 и

Ser267, играют решающую роль во взаимодействии Tau с 14-3-3, и мутации в любом из этих сайтов значительно ослабляют взаимодействие [167]. Принимая это во внимание, мы решили тщательно проанализировать состояние pTau^{coex} с помощью масс-спектрометрии. При более 90% покрытии последовательности His₆-3С-Tau нам удалось подтвердить интактность его N-конца, однако не удалось подтвердить наличие последних 3 аминокислот –QGL-COOH, что, скорее всего, указывает на протеолитическую деградацию Tau, экспрессируемого в *E.coli*. Тем не менее, электрофореграмма указывает на высокую чистоту и отсутствие протеолитических фрагментов, обычно в той или иной степени присутствующих во всех препаратах Tau, полученных классическими методами [248, 519, 520]. Примечательно, что с точки зрения отсутствия фрагментов Tau наш протокол экспрессии и очистки, по-видимому, превосходит опубликованный почти одновременно протокол, использующий усеченные мутанты Tau с гис-тагом, отщепляемым TEV протеазой [521].

Масс-спектрометрический анализ фосфопептидов показал, что pTau^{coex} сильно фосфорилирован как минимум по 7 остаткам (Рис. 55). Фосфорилирование Ser320 и Ser327 может объяснить электрофоретический сдвиг [511] ко-экспрессированного Tau на ДСН-геле (Рис. 54Б). Мы подтвердили фосфорилирование основных описанных нами ранее 14-3-3-связывающих участков, то есть Ser156, Ser235 и Ser267 (Рис. 55) [167]. Особенно интересно, что мы подтвердили фосфорилирование остатков Ser204 (сайт KIGpSTE), Thr187 (сайт RLQpTAP) и Ser320 (сайт RHLpSNV) (Рис. 55), которые фосфорилируются различными протеинкиназами помимо PKA [504, 522-527]. Например, фосфорилирование Ser204, Ser235, Ser267 и Ser156 под действием PKA и MARK (киназа, регулирующая сродство Tau к микротрубочкам) значительно снижали сродство Tau к тубулину и ингибировали сборку Tau в парные спиральные филаменты [504]. Ранее было показано фосфорилирование остатка Thr187 (сайт RLQpTAP) под действием Rho-зависимой киназы (ROCK) [524], важнейшего регулятора нескольких нейрональных функций [528], и даже под действием пролин-направленной митоген-активируемой протеинкиназы p38 [525]. Тем не менее, PKA крайне не эффективно фосфорилирует этот участок *in vitro* [504]. Интересно, что этот сайт перекрывается с одним из участков LQTA, непосредственно участвующих в связывании Tau с тубулином (Рис. 55) [529]. Хотя его микроокружение (RLQpTAP) идеально соответствует консенсусным 14-3-3-связывающим мотивам (Рис. 55) [34], прямое участие его в связывании с 14-3-3 не было описано. Таким образом, нам удалось показать фосфорилирование нового потенциального 14-3-3-связывающего участка в Tau под действием PKA в системе ко-экспрессии, при том что его фосфорилирование *in vitro* неэффективно.

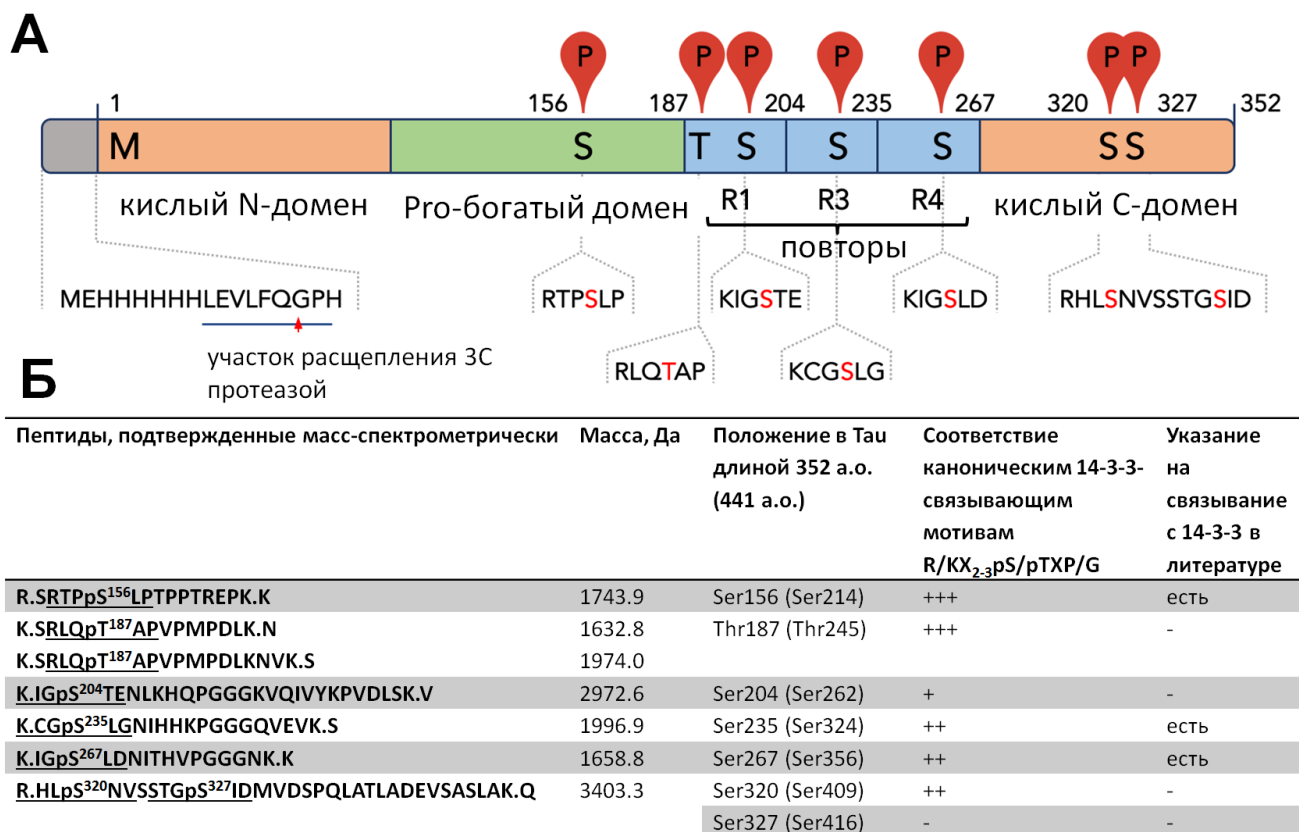


Рис. 55. Фосфорилирование Тау белка человека в результате ко-экспрессии с ПКК. А. Схема зародышевой изоформы Тау белка с указанием основных элементов. Семь идентифицированных участков фосфорилирования РКА показаны (P). Нумерация соответствует Тау длиной 352 остатка (R1, R3, R4 – тубулин-связывающие повторы). Названия доменов и участок расщепления 3С приведены. Б. Масс-спектрометрическая идентификация фосфорилированных участков с указанием нумерации для двух альтернативно сплайсированных изоформ Тау (352 и 441 остатков) и их соответствия 14-3-3-связывающим мотивам (подчеркнуты) от «-» (низкое сходство) до «+++» (высокое сходство). Места трипсинолиза обозначены точкой.

Так, мы установили, что рТау^{coex} фосфорилируется не только по нескольким уже известным, но и по новым потенциальным сайтам связывания 14-3-3, что делает целесообразным его использование для исследования взаимодействия с 14-3-3. В настоящее время иерархия и взаимосвязь между этими множественными сайтами фосфорилирования и связыванием с 14-3-3 неясны. Способность конкретного 14-3-3-связывающего сайта (например, Thr187) фосфорилироваться несколькими киназами может иллюстрировать необходимость тонкой регуляции его взаимодействия с 14-3-3. В то же время, конкретный фермент, который фосфорилирует этот сайт, может не иметь столь решающего значения для структурных исследований комплексов с 14-3-3, поскольку в этом случае более важным является его фосфорилирование само по себе.

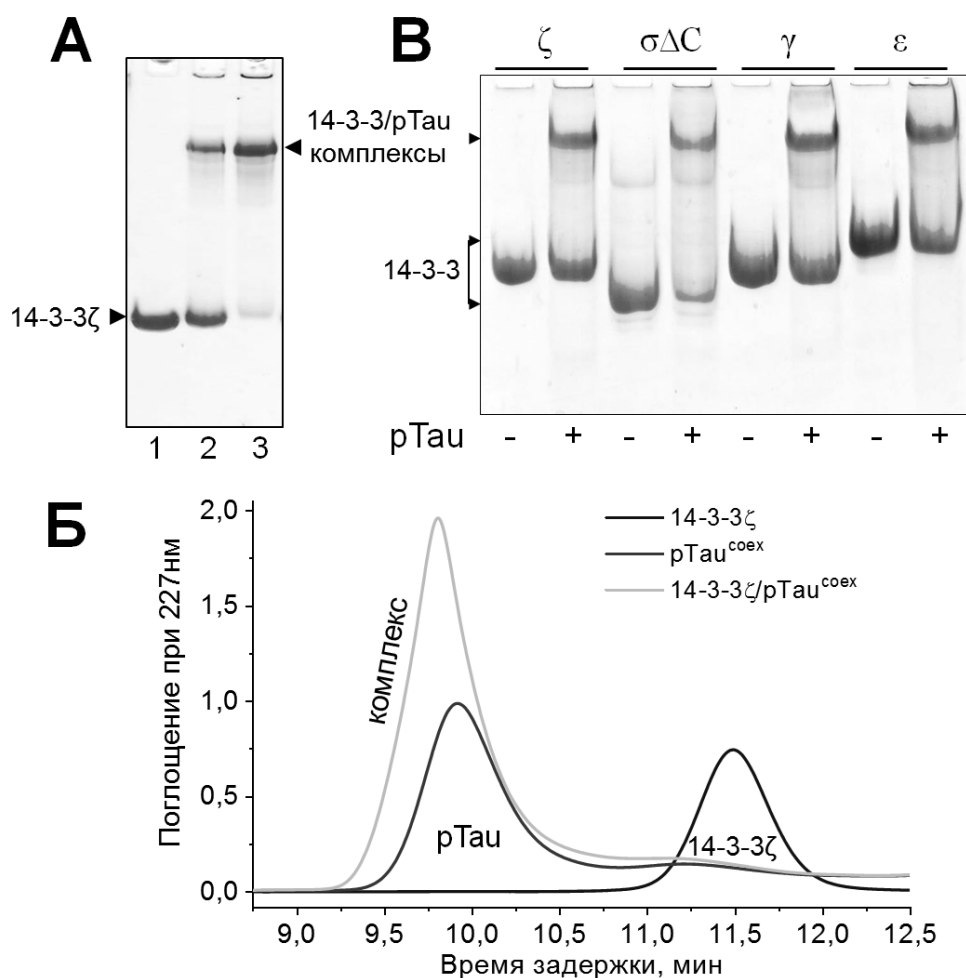


Рис. 56. Подтверждение взаимодействия между рТau^{coex} и 14-3-3ζ с помощью нативного гель-электрофореза и ГФ. А. Нативный гель-электрофорез 14-3-3ζ (1) или его смеси с 0,5х (2) или 1х (3) концентрацией рТau^{coex}. Полоса свободного 14-3-3 уменьшается за счет образования полосы с более низкой подвижностью, которая соответствует его комплексу с рТau (последний имеет рI > 9 и не входит в гель при рН 8,6). Б. Взаимодействие различных изоформ 14-3-3 и рТau^{coex}, по данным нативного гель-электрофореза. Нечетные дорожки – изоформы 14-3-3, четные – их смеси с рТau^{coex}. Верхние полосы соответствуют комплексам 14-3-3/рТau. В. Профили элюции очищенного 14-3-3ζ, рТau^{coex} или их смеси, полученные с использованием колонки Superdex 200 Increase 10/300 (GE Healthcare) при скорости потока 1,2 мл/мин при детекции поглощения на 227 нм.

Тau, фосфорилированный при ко-экспрессии с РКА, способен связываться с 14-3-3. На следующем этапе функциональность рТau^{coex} была проверена по его способности взаимодействовать с 14-3-3. Очищенный рТau^{coex} смешивали с 14-3-3ζ в двух соотношениях и затем анализировали с помощью нативного гель-электрофореза (Рис. 56А). Эта электрофоретическая система удобна для подобного анализа [167, 248], поскольку она легко отделяет белок Тау, обладающий щелочным рI и низкой электрофоретической

подвижностью, 14-3-3, обладающий кислым pI и высокой подвижностью, и их комплексы с промежуточной подвижностью [248]. В согласии с нашими предыдущими наблюдениями [167, 248], этот эксперимент показал способность рTau^{coex} прочно взаимодействовать с 14-3-3ζ (Рис. 56А). Взаимодействие было подтверждено с помощью гель-фильтрации. В то время как 14-3-3ζ и рTau^{coex} давали хорошо разделенные пики с временем элюции 11,5 и 9,9 мин, соответственно, профиль элюции смеси этих белков был представлен одним пиком с максимумом при 9,8 мин. Этот пик имел значительно большую амплитуду, чем амплитуда пика Тау, и был смещен в сторону меньших времен удерживания (Рис. 56Б), что указывало на образование комплекса 14-3-3ζ/рTau^{coex}.

Различные изоформы 14-3-3 обнаруживаются в агрегатах, содержащих гиперфосфорилированный Тау, что характерно для тауопатий [82, 530]. Хотя прямое взаимодействие рTau с 14-3-3ζ было показано ранее [167, 186, 247, 248], данные о взаимодействии различных изоформ 14-3-3 с рTau отсутствовали. Чтобы ответить на этот вопрос, мы проанализировали взаимодействие рTau^{coex} с изоформами 14-3-3ε, γ, ζ и σΔС с помощью нативного гель-электрофореза (Рис. 56Б). По аналогии с Рис. 56А, эксперимент ясно показал, что все указанные варианты 14-3-3 способны образовывать стабильные комплексы с рTau^{coex}, доказывая функциональность ко-экспрессированного Тау и оправдывая использование разработанной системы ко-экспрессии.

3.2.1.3. Тройная ко-экспрессия Тау с РКА и 14-3-3

Установив, что рTau^{coex} прочно взаимодействует с очищенными изоформами 14-3-3, повторяя, таким образом, свойства белка, фосфорилированного *in vitro*, мы переключились на систему тройной ко-экспрессии. Компетентные клетки BL21(DE3), экспрессирующие гис-таговые РКА и Тау, трансформировали плазмидой CDF-14-3-3σΔС для получения одновременной экспрессии Тау, РКА и 14-3-3 (Рис. 52, справа). После оптимизации условий роста и индукции мы получили экспрессию всех трех компонентов системы, где Тау был минорным компонентом (Рис. 57). Ко-экспрессия 14-3-3 не влияла на характер фосфорилирования Тау, как видно из масс-спектрометрической идентификации тех же самых фосфопептидов, что и в случае двойной ко-экспрессии Тау и РКА.

Подобно двойной ко-экспрессии, РКА и Тау связывались с Ni-сефарозой из-за наличия гис-тагов, при этом Тау связывался количественно, судя по его отсутствию во фракции проскока (Рис. 57). Ожидалось, что не имеющий гис-тага 14-3-3 не сможет самостоятельно связываться со смолой, однако он со-очищался с рTau по всему профилю

ИМАС1, несмотря на этап тщательной промывки колонки (фракции «w1» и «w2»). Это убедительно означало прочное взаимодействие между рТau и 14-3-3 при ко-экспрессии, при этом образованные комплексы выдерживали условия лизиса и очистки. Поскольку значительная часть 14-3-3 была обнаружена во фракциях «проскока» и «промывки», мы пришли к выводу, что Тау был экспрессирован в субстехиометрических количествах, которые обеспечивали хорошие условия для его насыщения избытком 14-3-3. В выбранных условиях, мы обнаружили 14-3-3 практически во всех фракциях рТau при почти постоянном соотношении интенсивностей полос, что указывало на образование стабильных комплексов с постоянной стехиометрией. Несмотря на такой успешный результат с рТau, мы полагаем, что параметры очистки комплексов 14-3-3, полученных при ко-экспрессии, необходимо оптимизировать для каждого конкретного белка-партнера в зависимости от его сродства к 14-3-3.

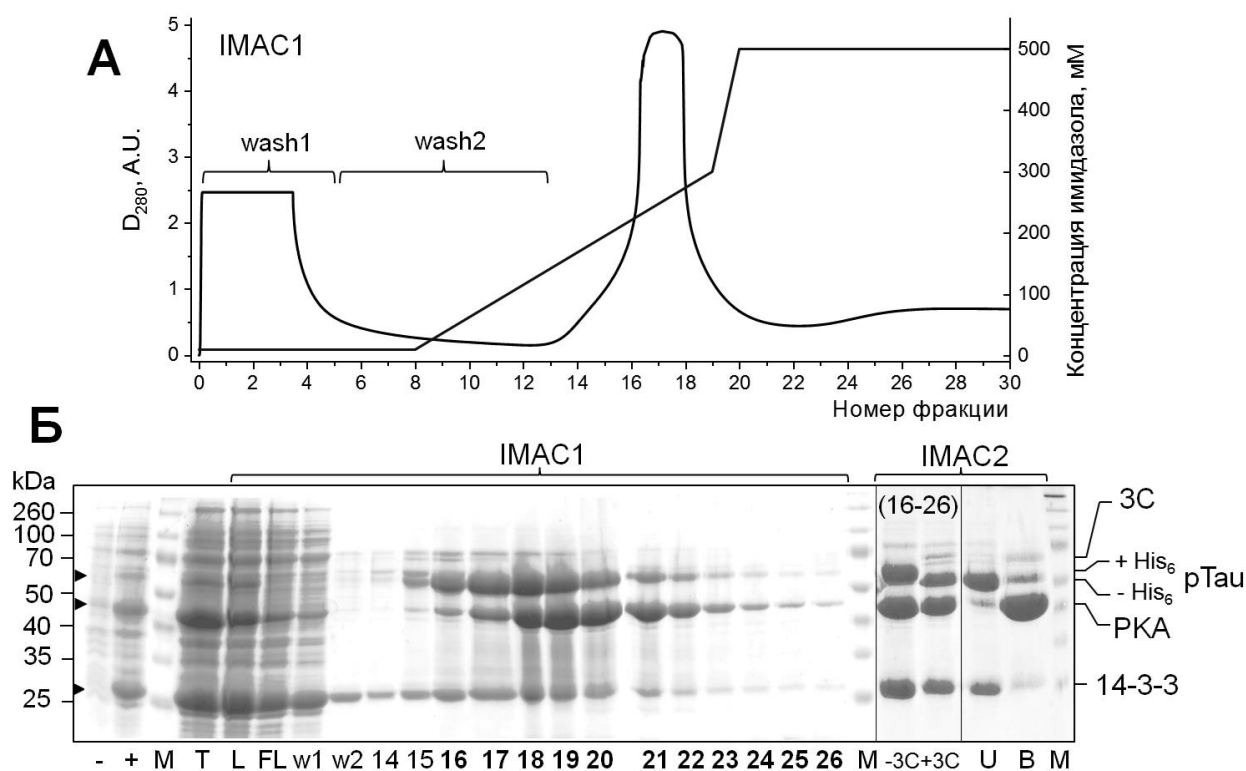


Рис. 57. Полученные при ко-экспрессии рТau и 14-3-3 $\sigma\Delta$ C соочищаются в виде комплекса. А. Профиль ИМАС1, полученный с использованием 10-500 мМ градиента имидазола (ломаная линия) при детекции на 280 нм (плавная линия) (А), с электрофоретическим анализом фракций (Б, слева). Стрелки слева указывают положения 14-3-3 (26 кДа), РКА (45 кДа), рТau (52 кДа). Неиндуцированный (-) и индуцированный ИПТГ (+) образец; ИМАС1: образец нанесения (L), проскок (FL), промывка 1 (фракции 1-5; w1) и промывка 2 (фракции 6-13; w2), а также фракции элюата (цифры). ИМАС2: объединенные фракции 16-26 (жирный шрифт), содержащие 14-3-3 $\sigma\Delta$ C, РКА и рТau (-3C), диализовали в присутствии 3C протеазы (+3C) для отщепления His-тага на рТau (сдвиг подвижности отмечен), а затем подвергли ИМАС2, собирая проскок (U; при 20 мМ имидазоле) и элюат (B; при 500 мМ имидазоле). М, белки-маркеры (указаны в кДа слева).

Для отщепления гис-тага в рТau элюат, содержащий белки, связанные с Ni-сефарозой (рТau, РКА, 14-3-3), обрабатывали 3С протеазой, также несущей гис-таг (Рис. 52 и Рис. 57Б; «-3С», «+ 3С»). После удаления имидазола при диализе, элюат повторно наносили на колонку Ni-сефарозы (ИМАС2, см. Рис. 52 и Рис. 57Б; «ИМАС2»). Как и ожидалось, обработка 3С приводила к смещению полосы Тау в сторону меньших масс (расчетная масса гис-тага ~1,6 кДа) и к миграции как рТau, так и связанного с ним 14-3-3, во фракцию проскока. Несущие гис-таги РКА и 3С, а также примесные белки снова связывались со смолой (Рис. 57Б; «ИМАС2», полоса «В»). Было показано, что второй этап ИМАС является очень эффективным, давая высокоочищенную смесь рТau и 14-3-3 (Рис. 57Б; ИМАС2, дорожка «U»), находящуюся уже в буфере с низким содержанием имидазола и принципиально готовую к дальнейшим исследованиям, в том числе структурным.

Таким образом, мы разработали и оптимизировали систему двойной и тройной ко-экспрессии для получения фосфорилированных белков или их комплексов с 14-3-3, соответственно. Эта система принципиально применима и для других белков-партнеров 14-3-3, например, для менее охарактеризованного гомолога Тау – белка 2с, связанного с микротрубочками (MAP2с) [531], и имеет следующие преимущества:

- (i) исключает необходимость готовить многокомпонентные смеси и подбор условий для фосфорилирования *in vitro*, включая концентрации Mg-АТФ, протеинкиназы, белка-субстрата, состава буфера. Фосфорилирование происходит не в разбавленном растворе, а во внутриклеточной среде, более физиологичной для фосфорилирования целевого белка и его связывания с 14-3-3,
- (ii) гибкая и универсальная, модульная система для получения готового фосфорилированного белка или его комплекса с 14-3-3 без необходимости индивидуальной очистки нескольких компонентов (14-3-3, белок-партнер, киназа) и подбора условий для фосфорилирования и сборки комплекса с правильной стехиометрией *in vitro*,
- (iii) удобный способ получения готовых стехиометрических комплексов 14-3-3 для непосредственного использования в структурных исследованиях. Использование тройной ко-экспрессии, вероятно, подходит только для белков-партнеров с особенно высоким сродством к 14-3-3.

Гибкость системы подчеркивается тем фактом, что любой ее элемент может быть изменен и дополнительно модернизирован для повышения производительности. Например,

для использования изоформ 14-3-3, подверженных фосфорилированию, могут помочь аминокислотные замены, блокирующие сайт-специфическое фосфорилирование. Описанная система рассчитана на использование РКА для фосфорилирования партнера 14-3-3. Хотя другие протеинкиназы, вероятно, также могут быть использованы, ограничение может быть связано с их экспрессией в неактивной или нерастворимой форме в бактериях. В обход этого, можно модифицировать фосфорилируемые сайты белков-партнеров, облегчая их фосфорилирование с помощью РКА, при условии, что достоверно известно, что конкретные положения действительно фосфорилируются (неважно, какой киназой) и распознаются 14-3-3 *in vivo*. Успешные примеры такой инженерии для обеспечения фосфорилирования определенного сайта под действием РКА можно найти в литературе [238]. Степень и специфичность фосфорилирования конкретных сайтов при ко-экспрессии с РКА в бактериях следует проверять для каждого конкретного белка-партнера. При необходимости можно управлять фосфорилированием с помощью сайт-направленной модификации (например, выключения) нежелательных сайтов. Перспективной альтернативой представляется использование так называемого расширения генетического кода (GCE, genetic code expansion), при котором специальные штаммы бактерий ко-трансляционно включают в нужные места последовательности фосфорилированные аминокислотные остатки [532, 533]. В настоящий момент такие системы еще довольно редки и имеют ряд ограничений.

3.2.1.4. Применение системы ко-экспрессии для получения фосфорилированного белка STARD1

Мы применили разработанную систему ко-экспрессии для получения другого белка-партнера 14-3-3, стероидогенного регуляторного белка STARD1 человека, который отвечает за доставку в митохондрии клеток надпочечников и половых желез молекул холестерина, необходимых для синтеза стероидных гормонов [534-537]. Этот белок связывает липиды и обладает плохой растворимостью [538-540], поэтому нам пришлось использовать систему его получения в виде слитой конструкции с мальтозо-связывающим белком (MBP) (Рис. 58А) [347]. MBP, несущий на N-конце гис-таг и отщепляемый вместе с ним от последовательности STARD1 под действием 3С протеазы, позволял провести эффективную очистку растворимого STARD1 (Рис. 58Б,В) и его мутантных форм. Полученный в результате белок имел набор элементов вторичной структуры, сходный с таковым в кристаллической структуре липид-связывающего домена STARD1 (Рис. 58Г) [541].

При ко-экспрессии STARD1 с РКА мы обнаружили фосфорилирование консервативных остатков Ser57 и Ser195, известных из литературы [542], а также фосфорилирование остатка Ser56, соседнего с Ser57 (Табл. 24). Остаток Ser56 является полуконсервативным (например, у овечьего гомолога на его месте стоит Gly) и, будучи фосфорилированным, может негативно влиять на связывание с 14-3-3, аналогично другим похожим примерам, известным из литературы [157, 543]. Поэтому наряду с белком дикого типа мы получили мутантные формы с заменами S56G и S56A, которые обнаруживали фосфорилирование только по Ser57 и Ser195 (Рис. 58Д). Дважды фосфорилированный STARD1 был способен взаимодействовать с белками 14-3-3 [544]. Таким образом, мы вновь показали, что система ко-экспрессии с РКА подходит для получения фосфорилированных белков-партнеров 14-3-3.

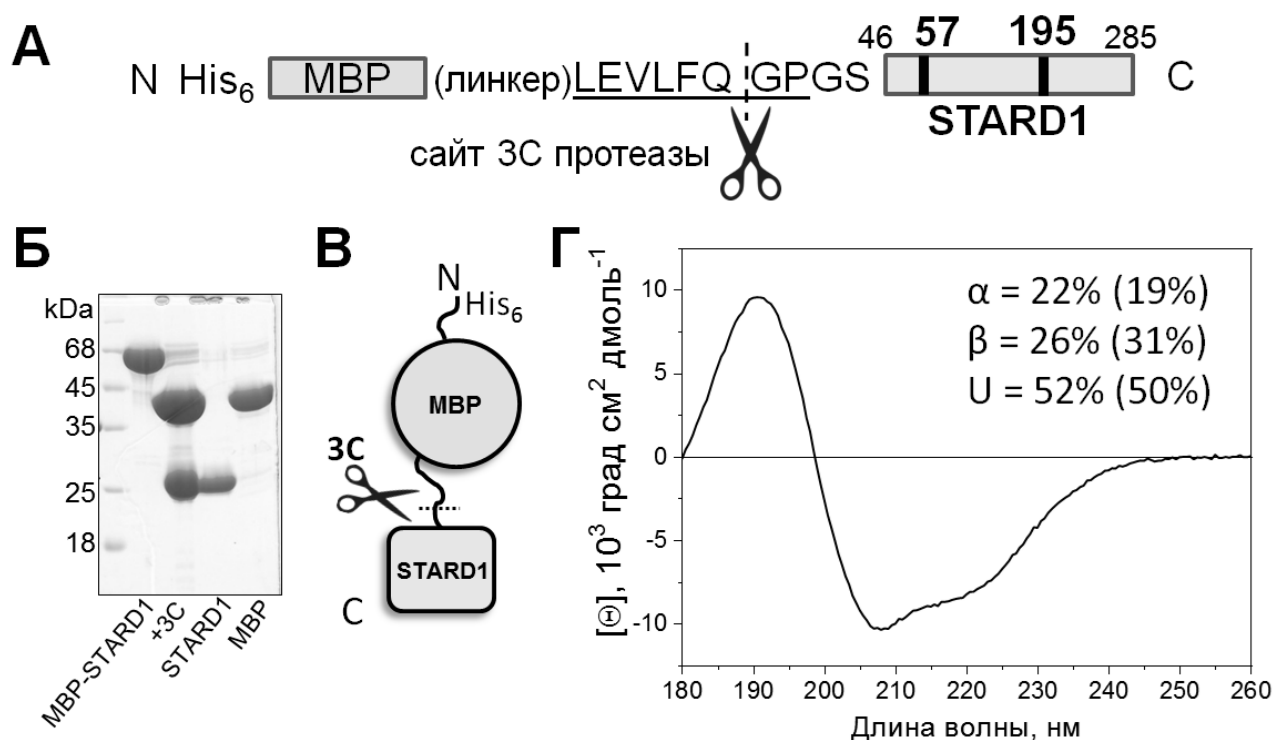


Рис. 58. Получение фосфорилированного белка STARD1 человека при ко-экспрессии с РКА. А. Дизайн конструкции для бактериальной экспрессии STARD1, состоящей из мальтозо-связывающего белка (MBP), отщепляемого от последовательности STARD1, расположенной на С-конце, с помощью 3С протеазы. Два основных остатка фосфорилирования РКА, Ser57 и Ser195, отмечены. Б. ДСН-электрофореграмма, показывающая возможность расщепления слитной конструкции с отделением свободного STARD1 от MBP и РКА, несущих гис-таги, при металл-аффинной хроматографии. В. Доменная организация такой конструкции. Г. Спектр КД в дальнем УФ препарата STARD1, показывающий наличие набора вторичных структур, близкого к кристаллографической конформации (код PDB 3P0L, доли соответствующих структур указаны в скобках).

Табл. 24. Идентификация фосфорилирования остатков Ser57 и Ser195 в STARD1 при его ко-экспрессии с РКА, по данным масс-спектрометрии. Наряду с целевым остатком Ser57, было обнаружено фосфорилирование полуконсервативного остатка Ser56, что эффективно устранялось его заменой на Gly или Ala. *Приведены данные только для S56G замены.

Фосфорил. остатки	Пептид	Масса пептида, Да	Образцы, где наблюдается
Ser195	RGpS ¹⁹⁵ TCVLAGMATDFGNMPEQK RRGpS ¹⁹⁵ TCVLAGMATDFGNMPEQK	2293,0 2449,1	Во всех образцах после ко-экспрессии с РКА
Ser56+Ser57	RRpS ⁵⁶ pS ⁵⁷ LLGSRLEETLYSDQELAYLQQGEEAMQK	3888,9	В немутированных образцах STARD1 человека
Ser57	RGpS ⁵⁷ LLGSR RRGpS ⁵⁷ LLGSR	925,4 1081,5	В образцах STARD1 с заменой S56G*

3.2.2. Химерные конструкции на основе белков 14-3-3

3.2.2.1. Дизайн химерных конструкций 14-3-3 с пептидами белков-партнеров для структурных исследований

Традиционным подходом к изучению комплексов 14-3-3 является ко-кристаллизация с синтетическими фосфопептидами, однако растворимость пептидов, их дороговизна, а также проблемы со стехиометрией и заселенностью связывания в кристаллических структурах являются неоспоримыми ограничениями. В качестве альтернативного подхода мы предположили использование химерных конструкций, состоящих из 14-3-3 и последовательности фосфорилируемого пептида, соединенных коротким гибким линкером. Такой подход был вдохновлен редкой конформацией белка 14-3-3 из *Cryptosporidium parvum* (код PDB 3EFZ, Рис. 59А). В этой структуре остаток Ser собственного С-концевого пептида был спонтанно фосфорилирован при экспрессии в *E.coli* под действием эндогенных протеинкиназ, и, вследствие этого, канонически связан в АБ 14-3-3. Это позволяло нам оценить длину линкера, необходимого для успешного создания искусственных химер 14-3-3 (Рис. 59Б). Опираясь на то, что С-концевые пептиды различных 14-3-3 представляют собой наиболее вариабельную область этих белков, мы сконструировали несколько химер 14-3-3 с фосфорилируемыми пептидами разных белков-партнеров (Рис. 59Б).

Чтобы выяснить, будут ли предложенные химерные белки 14-3-3, слитые с разными фосфопептидами, пригодны для структурных исследований, мы разработали прототип

химеры на основе установленной нами кристаллической структуры комплекса 14-3-3 σ с фосфопептидом белка B6 (код PDB 5LU2), содержащего фосфорилируемый остаток Ser16. Используя выгодное близкое расположение С-конца жесткой части 14-3-3 и N-конца фосфопептида в кристаллической структуре (код PDB 5LU2), мы присоединили последовательность пептида к С-концу белка 14-3-3. В качестве каркаса для химеры был использован легко кристаллизующийся укороченный с С-конца мутантный вариант 14-3-3 σ человека, не фосфорилируемый по остатку Ser58 в димерном интерфейсе под действием РКА (белок Clu3, см. Рис. 40). Длина линкера между последовательностью 14-3-3 и пептидом имела решающее значение для обеспечения правильного взаимодействия фосфопептида в амфипатической бороздке 14-3-3. К примеру, параллельно китайскими учеными была сделана неудачная попытка получить химеру 14-3-3 ζ с псевдофосфорилированным фрагментом опухолевого супрессора LKB1, поскольку чересчур длинный линкер, выбранный ими, привел к связыванию пептида в неправильной конформации (код PDB 4ZDR) [545, 546].

Мы же в выборе длины линкера ориентировались на длину С-концевого сегмента белка 14-3-3 из *C.parvum* (код PDB 3EFZ) (Рис. 59А), которая составила десять остатков между высококонсервативным С-концевым остатком триптофана 14-3-3 (положение 0, Рис. 59Б) и фосфорилированным остатком, связанным в АБ 14-3-3 (позиция 10, Рис. 59Б). Таким образом, линкер, используемый нами для слияния фосфопептида B6 с С-концом 14-3-3 $\sigma\Delta$ C, включал в себя: упорядоченный консервативный остаток Thr в положении 1, который присутствует в картах электронной плотности даже для усеченного на С-конце 14-3-3 варианта; эндогенный остаток Leu белка B6, который предшествует его 14-3-3-связывающему мотиву LRRApS¹⁶APL; и непосредственно линкерный сегмент GSGS для обеспечения максимальной гибкости и полярности в прототипной химере, которая была обозначена «CH1» (Рис. 59Б). Другие химеры 14-3-3 $\sigma\Delta$ C включали пептиды из физиологических белков-партнеров 14-3-3, чьи комплексы не были закристаллизованы ранее. Таким образом, были получены химеры 14-3-3 σ с пептидами Gli1-3 (CH2), AANAT (CH3) и STARD1 (химеры CH4 и CH5; Рис. 59Б).

Химеры были экспрессированы в виде конструкций, несущих N-концевой His-таг, отщепляемый высокоспецифичной 3С протеазой для облегчения очистки (Рис. 59В). Чтобы достичь стехиометрического фосфорилирования целевых остатков пептидов в химерах, мы ко-экспрессировали их в *E.coli* с РКА, которая, по данным литературы, фосфорилирует все эти мишени *in vivo* [228, 323, 542, 547]. Важно, что сам 14-3-3 σ , в отличие от большинства

других изоформ 14-3-3, не подвергался фосфорилированию под действием РКА при ко-экспрессии (Рис. 53А).

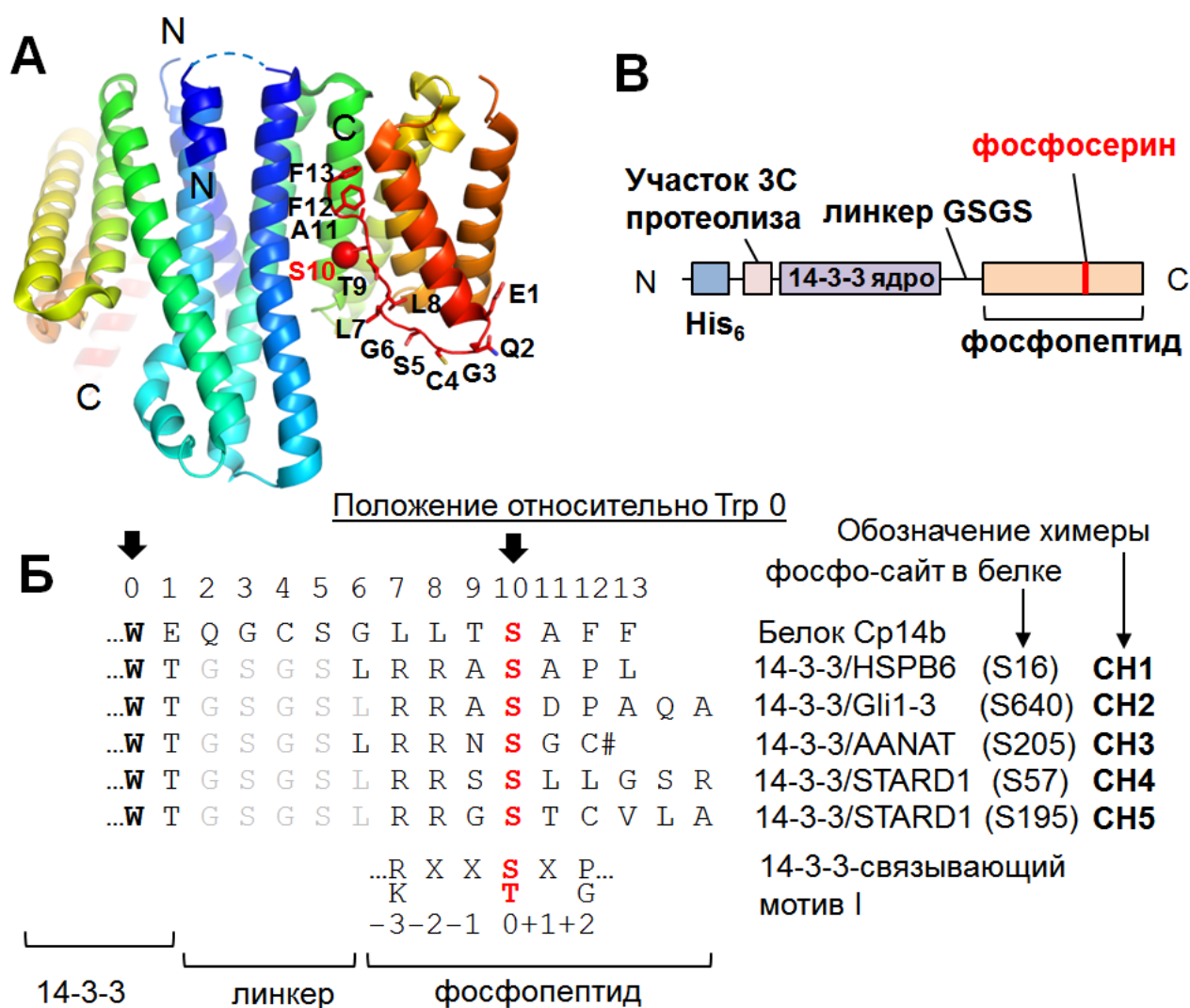


Рис. 59. Дизайн химер 14-3-3 с фосфопептидами белков-партнеров. А. Прототипная кристаллическая структура 14-3-3 из *C.parvum* (Cp14b) с фосфорилированным гибким С-концевым пептидом (пронумерованные остатки), связанным в АБ одной субъединицы 14-3-3 (код PDB 3EFZ). Каждая субъединица окрашена градиентом от N (синий) до С-конца (красный). Б. Выравнивание С-концевых областей Cp14b и химер CH1-CH5, показывающее линкер, соединяющий консервативный остаток Trp 14-3-3 (позиция 0, стрелка) и фосфо-сайт (позиция 10, стрелка). Линкерная последовательность выделена серым, а фосфо-сайт – красным шрифтом. Для сравнения показан 14-3-3-связывающий мотив I. В. Схематическое изображение химеры, несущей на N-конце гис-таг, отщепляемый 3С протеазой.

Разработанная конструкция позволила осуществить препаративную экспрессию растворимых фосфорилированных химер 14-3-3, которые были очищены стандартными хроматографическими методами (пример очистки для химер CH1-CH3 приведен на Рис. 60). Эта процедура позволяла получать миллиграммовые количества образцов белка, которые

были полностью растворимыми и чистыми более чем на 98% (см. Рис. 60, дорожка «Р»). Вначале была получена химера 14-3-3 ζ с пептидом В6 в нефосфорилированном (СН1, в отсутствие РКА) и фосфорилированном виде (рСН1, при ко-экспрессии с РКА), и проведена ее детальная характеристика (Рис. 61).

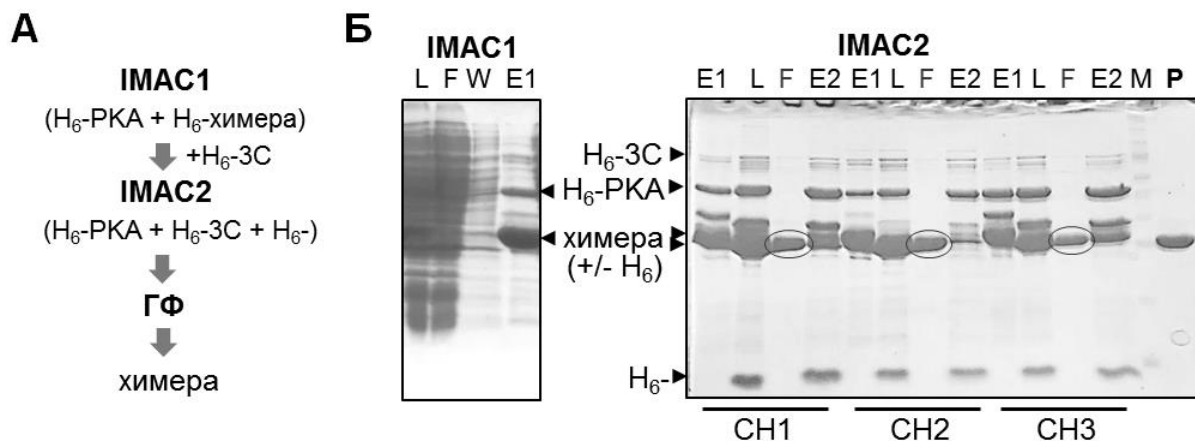


Рис. 60. Выделение и очистка химер 14-3-3 ζ с пептидами белков-партнеров после ко-экспрессии с РКА. А. Схема очистки для получения готовых к кристаллизации белков СН, фосфорилированных в ходе бактериальной ко-экспрессии с РКА, включающая вычитающую металлоаффинную хроматографию (IMAC1 и 2) для удаления N-концевого гексагистидинового тага 3С протеазой и гель-фильтрацию (ГФ). Б. Электрофоретический анализ фракций, полученных при IMAC1 и IMAC2 для СН1 (IMAC1) или СН1-СН3 (IMAC2). L – нанесение, F – просок (10 мМ имидазол), W – промывка (10 мМ имидазол), E1 – элюат 1 (510 мМ имидазол), E2 – элюат 2 (510 мМ имидазол) фракции. Отмечено смещение полос химер в результате удаления тага (+/- H₆). Фракции проскока (F) при IMAC2 (обведены кружками) подвергались дополнительной очистке с помощью ГФ перед кристаллизацией (Р – конечный образец).

Ко-экспрессия СН1 с РКА (рСН1) приводила к наличию у белка более высокой подвижности при нативном гель-электрофорезе, чем для его нефосфорилированного аналога СН1 (вставка на Рис. 61А). Фосфорилирование последнего с помощью РКА *in vitro* приводило к увеличению электрофоретической подвижности, тогда как дальнейшая инкубация со щелочной фосфатазой частично отменяла этот эффект (вставка на Рис. 61А), свидетельствуя о том, что он связан с фосфорилированием белка и что СН1 эффективно фосфорилируется РКА как *in vitro*, так и внутри бактериальных клеток.

Профиль ГФ для рСН1 содержал основной симметричный пик (пик «I», на который приходилось 85-90% белка), соответствующий частицам со средним гидродинамическим радиусом R_H 3,4 нм, и второстепенный пик (пик «II»), соответствующий частицам с радиусом 4,9 нм (Рис. 61А). Сравнение с профилями мономерной мутантной формы 14-3-3 ζ

(пик при 2,8 нм) и нефосфорилированного СН1 (одиночный симметричный пик с радиусом R_H 3,6 нм) означает, что пик I белка рСН1 соответствует димерной форме, тогда как пик II соответствует большей по размеру олигомерной форме, присутствующей в гораздо меньших количествах (10-15%). Меньший кажущийся радиус димера рСН1 (3,4 нм) по сравнению с димером нефосфорилированного варианта СН1 (3,6 нм) указывает на компактизацию химеры при связывании фосфопептида. Это хорошо согласуется с представлениями о пластичности субъединиц 14-3-3 [114, 299, 471] и движениями С-концевых половин субъединиц 14-3-3 от открытой конформации до закрытой, которая может стабилизироваться связыванием в АБ фосфорилированного лиганда, большего по размеру, чем ион фосфата (см. Рис. 37). Сдвиг на профиле ГФ свидетельствует о формировании этого закрытого состояния, связанного с пептидом. Можно предположить, что небольшая доля более крупных частиц с радиусом 4,9 нм, обусловлена формированием тетрамеров, в которых два димера обмениваются фосфопептидами (см. ниже).

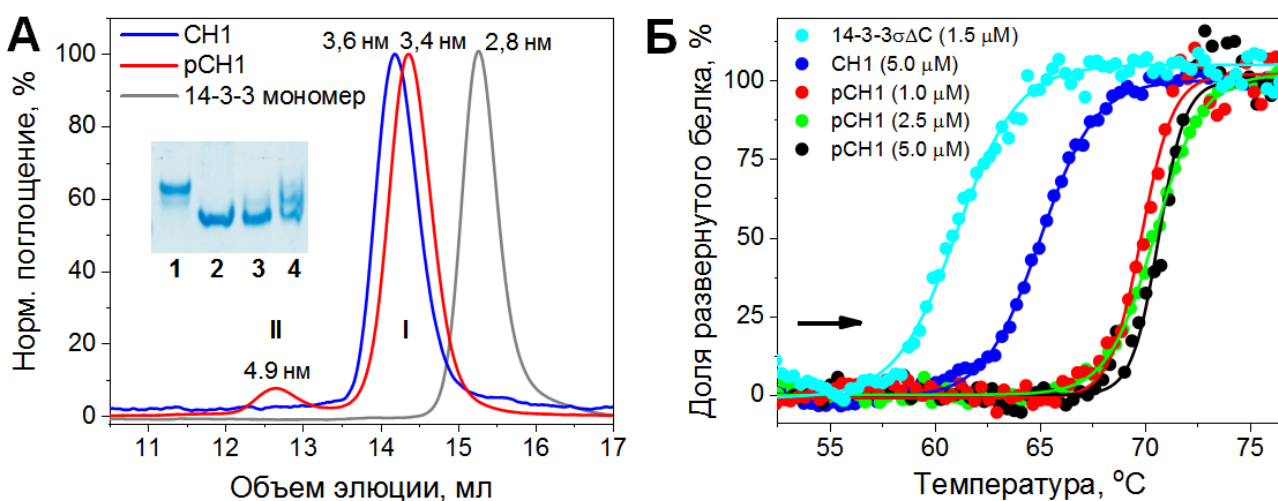


Рис. 61. Характеристика химеры СН1. А. Профили ГФ химеры 14-3-3σ с фосфопептидом В6, экспрессированной в отсутствие (СН1) или в присутствии РКА (рСН1), полученные с использованием колонки Superdex 200 Increase и нормализованные в максимуме. Для сравнения приведен профиль элюции мономерного варианта 14-3-3. Указаны радиусы Стокса, соответствующие максимумам пиков и полученные из калибровки колонки. Пики димеров (I) и тетрамеров (II) СН1 отмечены. На вставке показана миграция при нативном геле-электрофорезе для СН1 (1), СН1, ко-экспрессированного с РКА (2) или фосфорилированного РКА *in vitro* (3), или рСН1, дефосфорилированного щелочной фосфатазой *in vitro* (4). Б. Температурная зависимость триптофановой флуоресценции 14-3-3σΔС (1,5 μМ), СН1 (5 μМ) или рСН1 (1-5 μМ) при нагревании образцов с 10 до 80 °С с постоянной скоростью 1 °С/мин (направление нагревания указано стрелкой), показывающая эффект фосфорилирования на положение теплового перехода.

Для дальнейшей характеристики изменения конформации между несвязанным и связанным состояниями химеры СН1 мы использовали разработанную в нашей лаборатории методику [350] с использованием сканирующей флуориметрии. Мы сравнили химеру рСН1 с нефосфорилированным вариантом СН1 и димером 14-3-3σΔС (Рис. 61Б). В этом эксперименте нефосфорилированные СН1 и 14-3-3σΔС демонстрировали тепловую денатурацию с температурами полуперехода 61 и 65 °С, соответственно (Рис. 61Б, голубая и синяя кривая). В идентичных условиях температура полуперехода для рСН1 была ~ 70 °С, то есть на 5 или 10 °С выше, чем для СН1 и 14-3-3σΔС, соответственно, что указывало на стабилизацию белка. Мы полагаем, что такая стабилизация отражает связывание фосфопептида в АБ и компактизацию белка, наблюдаемую при ГФ. Важно отметить, что снижение концентрации рСН1 до 1 мкМ не приводило к какой-либо значительной дестабилизации, говоря о прочном связывании фосфопептида даже при низких концентрациях белка (Рис. 61Б). В то же время, добавление эквивалентного синтетического фосфопептида к белку при 1 мкМ концентрации обоих компонентов комплекса привело бы лишь к ≤ 12 % заселению связанного состояния (учитывая установленную нами ранее кажущуюся K_D $6,3 \pm 0,5$ мкМ, см. Рис. 35). Очевидное увеличение аффинности из-за повышения локальной концентрации взаимодействующих компонентов [548], вызванного ковалентным присоединением фосфопептида к 14-3-3, является потенциально выгодным для применения химер 14-3-3 для создания биосенсоров протеинкиназной активности [549], которые должны эффективно работать в том числе при низких концентрациях белка.

3.2.2.2. Кристаллическая структура прототипной химеры 14-3-3σ с фосфопептидом белка HSPB6

Химера рСН1 кристаллизуется в различных условиях в виде нескольких кристаллических форм (Рис. 62). Таким образом, в отличие от собственного неупорядоченного С-концевого сегмента 14-3-3, слияние фосфопептидов само по себе не препятствует кристаллизации. Поскольку кристаллизруемость в данном случае в основном определяется каркасом 14-3-3, можно было ожидать, что производные рСН1 с другими фосфопептидами также будут хорошо кристаллизоваться.

Две полученные кристаллические формы химеры рСН1 заметно отличаются друг от друга в первую очередь по ориентации и упаковке димеров 14-3-3 в кристалле (Рис. 62). В одной кристаллической форме С-концевые доли каждой из двух субъединиц в димере 14-3-3σ находятся в контакте с одной С-концевой долей каждого из двух соседних димеров (Рис.

62А). Они образуют вдоль 9-ой α -спирали 14-3-3 интерфейс, стабилизированный контактами между парами остатков Tyr213/Tyr213' и Gln221/Gln221' партнеров по симметрии. Как и ожидалось, химерный белок рСН1, ко-экспрессированный в бактериях с РКА, специфически фосфорилирован по аутентичному остатку Ser (Ser16, согласно нумерации В6). В структуре пары субъединиц, принадлежащих двум разным димерам 14-3-3, перекрестно стабилизируют друг друга за счет обмена фосфопептидами, которые связываются в АБ соседних димеров. Карты электронной плотности, рассчитанные с разрешением 2,35 Å (Рис. 62Б), позволяют однозначно проследить аминокислотные остатки для всего С-конца химеры рСН1, включая все остатки линкера, за исключением лейцина в положении +3 относительно рSer16. Находящийся непосредственно за пределами основного 14-3-3-связывающего мотива, RXXpSXP, этот остаток не имеет четкой электронной плотности, что свидетельствует о его конформационной подвижности. Примечательно, что довольно короткого линкера GSGS оказывается достаточно для того, чтобы позволить фосфопептиду связаться с АБ соседнего димера 14-3-3.

Важно отметить, что независимо от перекрестного обмена пептидами, ориентация и конформация фосфопептида в АБ были идентичны таковым для синтетического пептида В6, ко-кристаллизованного с 14-3-3 σ (коды PDB ID 5LU1 и 5LU2), с $C\alpha$ r.m.s.d. 0,23 Å для центрального сегмента RRApSAP (Рис. 62В). Это указывает на высокоспецифичное связывание пептида и отсутствие каких-либо значительных стерических препятствий, вызванных искусственностью химерной конструкции.

В полном соответствии с известными кристаллическими структурами пептидных комплексов 14-3-3, в полученной структуре фосфатная группа пептида образует солевые мостики с боковыми цепями консервативных остатков 14-3-3 σ Lys49, Arg56 и Arg129 и водородную связь с Tyr130 (Рис. 62Б). Атомы основной цепи остатков аланина, непосредственно примыкающих к фосфосерину, дают водородные связи с остатками Asn226 и Asn175 14-3-3 σ , аналогично тому, как это наблюдается в наших структурах 5LU1 и 5LU2. Это говорит о том, что химеры на основе 14-3-3 принципиально могут быть использованы для получения структурной информации о взаимодействии 14-3-3 с фосфопептидами любых белков-партнеров. Ковалентное присоединение фосфопептидов к 14-3-3 гарантирует молярное соотношение 1:1, устраняя необходимость в синтезе пептидов и оптимизации их концентрации для достижения высокой заселенности связанной формы, обеспечивая при этом получение дифрагирующих кристаллов.

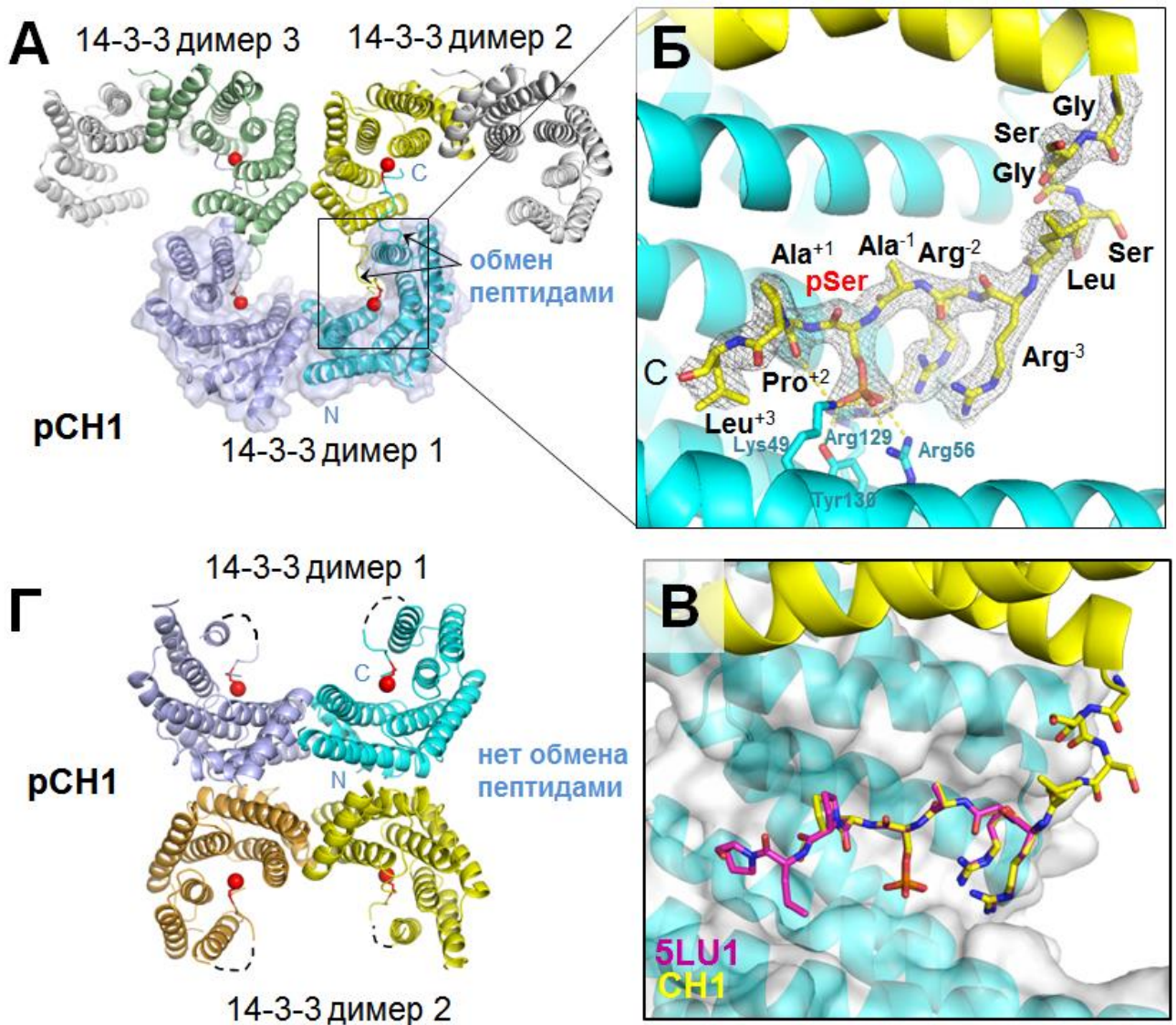


Рис. 62. Кристаллические структуры химеры 14-3-3 σ с фосфопептидом В6. А. Кристаллическая упаковка с обменом фосфопептидами (фосфорилированные остатки показаны красными сферами) между мономерами двух соседних 14-3-3 димеров (код PDB 5OK9, разрешение 2,35 Å). Физиологический димер 14-3-3 выделен полупрозрачной поверхностью. Б. Конформация линкера и фосфопептида показана с электронной плотностью 2Fo-Fc, имеющей контур 1 σ (остатки помечены цифрами, указывающими положения относительно pSer). В. Сравнение конформации фосфопептида в структуре, полученной с помощью химеры, и конформации синтетического пептида, ко-кристаллизованного с 14-3-3 σ (код PDB 5LU1). Г. Кристаллическая упаковка без обмена фосфопептидами (код PDB 5OKF, разрешение 3,2 Å). Пунктирные линии соответствуют неразрешенным частям линкера.

Эквивалентность белково-пептидных взаимодействий в химерных конструкциях была подтверждена второй кристаллической формой химеры pCH1, где в асимметричной единице мы обнаружили два димера 14-3-3 σ , расположенных «спина к спине» (Рис. 62Г). В этом случае было очевидно, что фосфопептиды связываются в АБ того же мономера, к которому присоединены ковалентно, что приводит к полностью занятым АБ. Несмотря на более

низкое разрешение соответствующей кристаллической структуры (3,2 Å), большинство остатков фосфопептида и несколько остатков линкера были разрешены в картах электронной плотности, что дало по сути ту же конформацию связанного фосфопептида, что и для кристаллической формы с обменом фосфопептидами (Рис. 62А).

Кристаллические структуры химеры рСН1 подтверждают предположения, сделанные из данных ГФ (Рис. 61А). Расчеты гидродинамических параметров частицы с помощью *HydroPro* [550] с использованием кристаллографического димера рСН1 (Рис. 62А) или димера димеров, стабилизированных перекрестным междимерными обменом фосфопептидами (Рис. 62А), позволили определить значения гидродинамического радиуса как 3,46 и 4,98 нм, соответственно. Это полностью соответствовало полученным при ГФ значениям 3,40 нм и 4,90 нм (Рис. 61А).

3.2.2.3. Кристаллические структуры химер 14-3-3σ с фосфопептидами белков Gli1-3, AANAT и STARD1

Поскольку первичные взаимодействия в прототипной химере рСН1 были эквивалентны таковым в комплексе 14-3-3 с синтетическим фосфопептидом, мы создали несколько химер 14-3-3 (СН2-СН5) в попытке получить первую структурную информацию для соответствующих комплексов. Все варианты химер 14-3-3 были экспрессированы в присутствии РКА, очищены и закристаллизованы аналогично рСН1 (Рис. 60), причем кристаллы, полученные уже при первом скриннинге, были пригодны для РСА, не требуя оптимизации. Это является большим преимуществом нового подхода и позволяет использовать его в широкопоточном формате в будущем.

РКА-зависимое фосфорилирование фактора транскрипции Gli, центрального игрока в передаче сигналов через Hedgehog [228], приводит к его взаимодействию с белками 14-3-3. Несмотря на отсутствие структурной информации о комплексе этих белков, одним из главных претендентов на роль ключевого фосфопептида считается фрагмент RRAS⁶⁴⁰DPAQA, который консервативен во всех белках Gli, т.е. Gli1, Gli2 и Gli3 [81, 228].

Кристаллическую структуру рСН2 удалось установить с разрешением 3,2 Å (Рис. 63А и Б). На независимую часть приходится один димер 14-3-3σ, который образует замкнутую циклическую структуру со своим партнером симметрии, где одна субъединица каждого димера предоставляет свой фосфопептид для взаимодействия в АБ ближайшей субъединицы соседнего димера (Рис. 63А и Б). При этом собственная АБ каждого из мономеров занята сульфат-ионом. Такой способ укладки представляет еще одну альтернативу двум

кристаллическим формам, обнаруженным в случае рСН1 химеры (Рис. 62). Несмотря на новый способ организации кристаллических контактов, в полученном комплексе центральный фосфорилированный остаток Ser640 связан теми же каноническими остатками АБ, что и фосфорилированные остатки в рСН1 и других известных комплексах 14-3-3 (см. Рис. 62 и Рис. 63).

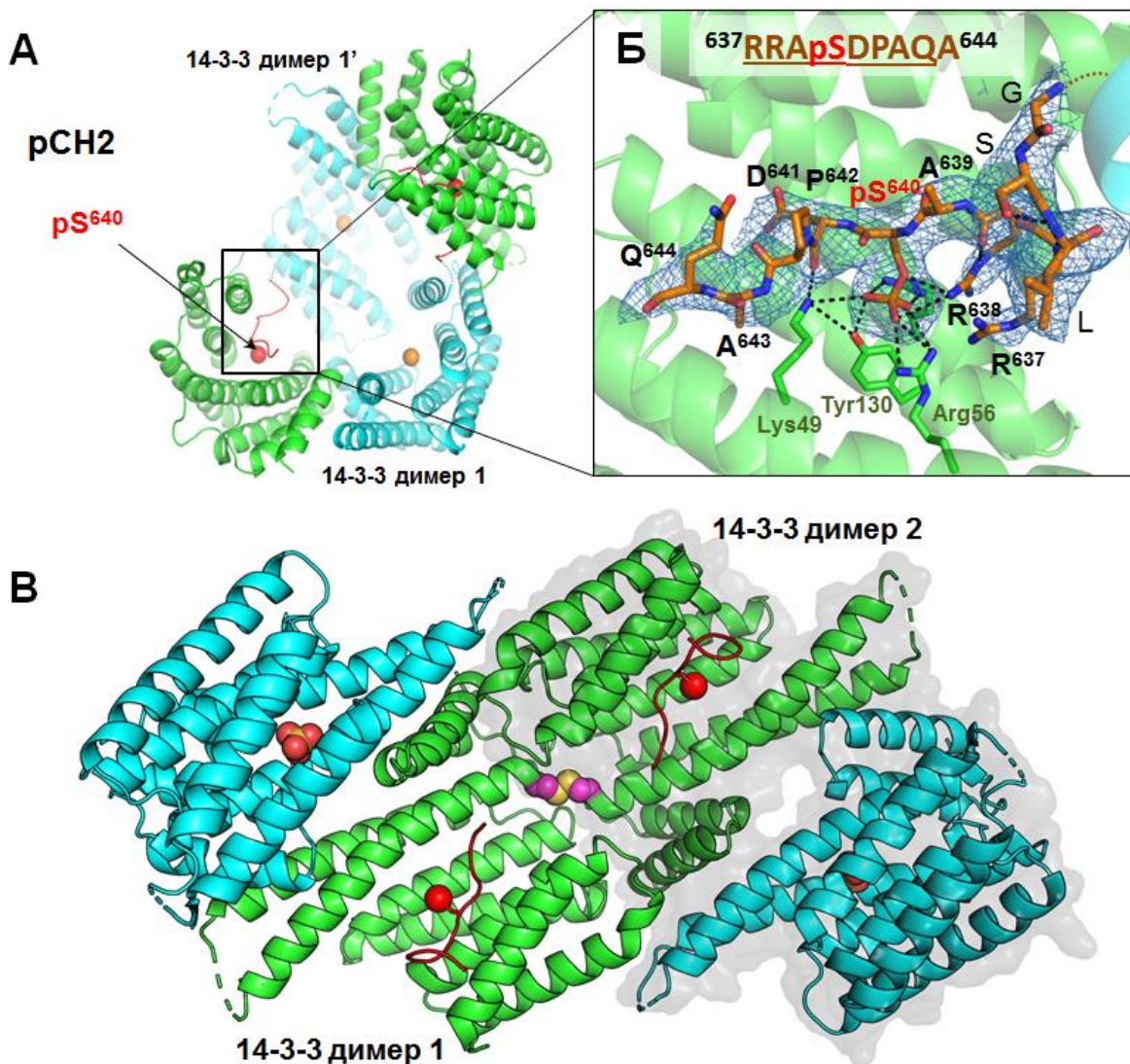


Рис. 63. Кристаллическая структура химеры 14-3-3 σ с фосфопептидом Gli1-3 (код PDB 5OM0, разрешение 3,2 Å). А. Кристаллическая упаковка двух соседних димеров 14-3-3 σ (субъединицы каждого димера показаны зеленым и голубым), обменивающихся фосфопептидами Gli1-3 (красные) с одной стороны и связывающих ионы сульфата (оранжевые) с другой. Б. Крупный план, показывающий связывание Gli1-3 фосфопептида, его 2Fo-Fc карту электронной плотности (контур 1 σ) и ключевые остатки. В. Образование дисульфидного мостика в кристаллической решетке химеры рСН2 между двумя димерами 14-3-3 σ , связанными кристаллографической симметрией. Субъединицы димеров отмечены зеленым и голубым, для наглядности контур одного из димеров продублирован полупрозрачной поверхностью. Связанные в АБ фосфопептиды Gli1-3 показаны красным, ионы сульфата и фосфатная группа отмечены сферами. Остатки Cys38, образующие мост (в центре), отмечены пурпурным (атомы серы – желтым).

Любопытно, что эта мода связывания оставляет два оставшихся фосфопептида в кристаллическом тетрамере не участвующими во взаимодействии с АБ и не разрешенными в картах электронной плотности. Вместо этого соответствующие АБ оказываются занятыми анионами сульфата, присутствующими в среде кристаллизации в высокой концентрации (Рис. 63А). Согласно нашей гипотезе о влиянии различных анионов на первичные взаимодействия с участием 14-3-3 (Рис. 34), очень высокая концентрация сульфата (2 М), вероятно, вынуждает фосфопептиды частично диссоциировать от АБ даже в составе химерных конструкций, в которых эффективная локальная концентрация фосфопептидов вблизи АБ априори является высокой даже при низких концентрациях белка, и тем более высока в условиях чрезвычайно большой локальной концентрации белка при росте кристаллов. Качество карт электронной плотности позволило однозначно проследить все остатки линкера и фосфопептида Gli1-3, за исключением последнего остатка аланина (Рис. 63Б). Интересно, что две ближайшие субъединицы 14-3-3, принадлежащие двум разным димерам и связывающие фосфопептиды, образуют дисульфидный мостик Cys38-Cys38' (Рис. 63В). Несмотря на наличие дисульфидного мостика, он достаточно удален от интерфейса 14-3-3/фосфопептид и, очевидно, не влияет на первичные взаимодействия. Тем не менее, данный реакционно-способный остаток Cys38 выгодно расположен относительно С-конца фосфопептида, связанного в АБ 14-3-3. С учетом этого, при флуоресцентном мечении Cys38 на основе полученной химерной конструкции можно пытаться создать биосенсор, детектирующий состояние АБ 14-3-3 (свободная/занятая лигандом).

Фосфорилирование под действием РКА фермента AANAT, катализирующего скорость-лимитирующую стадию превращения серотонина в мелатонин и отвечающего за регуляцию циркадных ритмов, по остаткам Thr31 и Ser205 приводит к связыванию AANAT с 14-3-3 [240, 547]. Несмотря на то, что кристаллическая структура белок-белкового комплекса 14-3-3/AANAT была получена в 2001 году [163], и явилась самой первой структурой комплекса 14-3-3 с каким-либо белком-партнером, конструкция, использованная при получении комплекса в оригинальной работе, не содержала С-концевого сегмента, несущего участок фосфорилирования Ser205 [163] (Рис. 11). Более того, только спустя несколько лет участок вокруг Ser205 был описан как особый 14-3-3-связывающий мотив типа III, который присутствует на С-конце целого ряда белков-партнеров 14-3-3 [35, 138, 551]. Таким образом, структурная информация по взаимодействию 14-3-3 с С-концевым фрагментом AANAT отсутствовала в литературе, что делало целесообразным получение структуры этого комплекса с помощью разработанного нами химерного подхода.

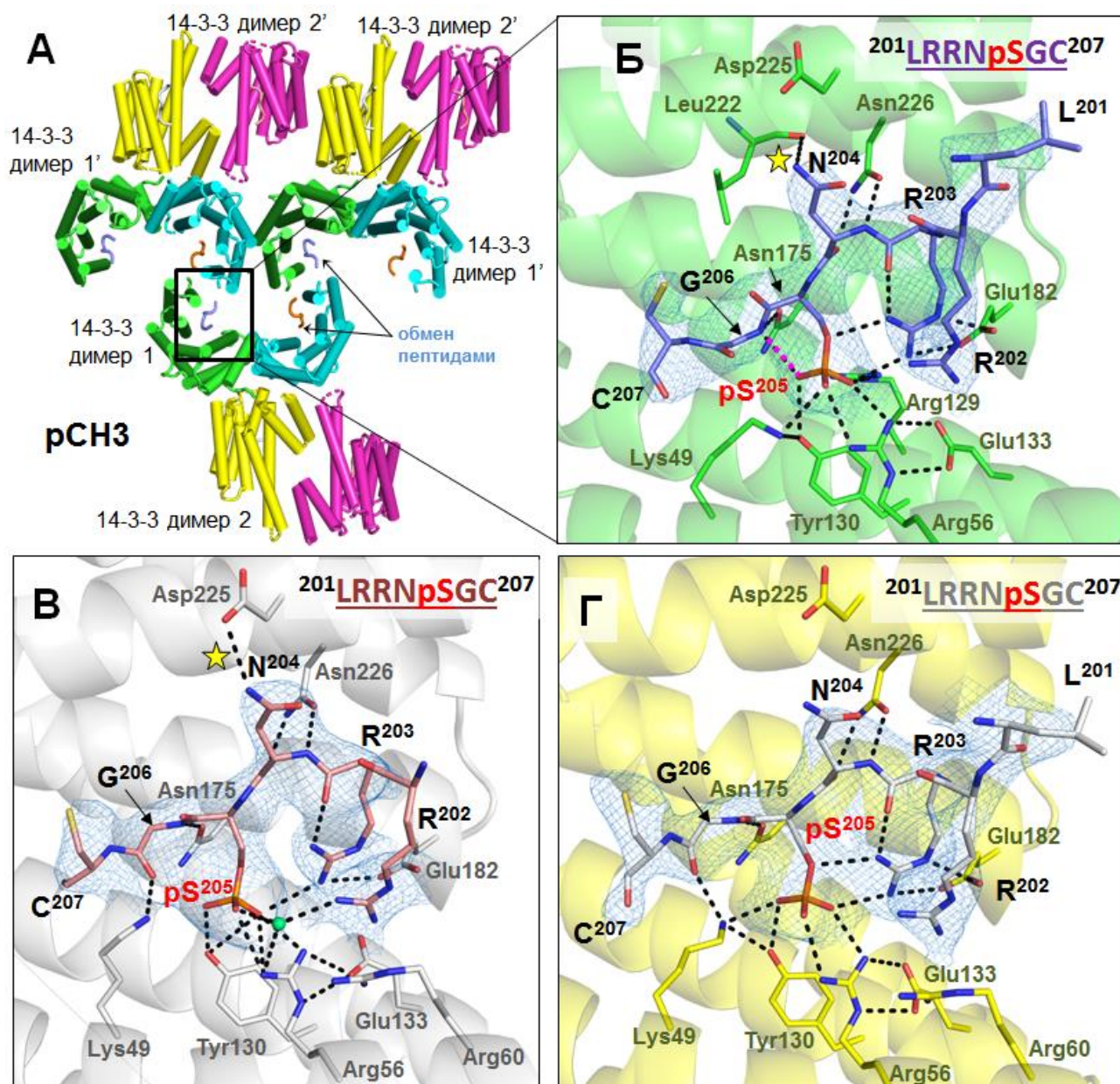


Рис. 64. Кристаллическая структура химеры 14-3-3 σ с фосфопептидом AANAT (код PDB 6T80, разрешение 3,0 Å). А. Кристаллическая упаковка химеры, стабилизированная обменом фосфопептидами. Б-Г. Три отличающихся конформации связанного с 14-3-3 фосфопептида AANAT, стабилизированные полярными контактами (черные пунктирные линии), показаны с картой электронной плотности 2Fo-Fc, имеющей контур 1 σ . Вверху приведена последовательность пептида. На панели Б пурпурным отмечена уникальная водородная связь между атомом азота основной цепи Gly206 фосфопептида и фосфатной группой, на панели В приведена молекула воды (зеленая сфера), опосредующая контакт Arg202 и фосфатной группы пептида. На панелях Б и В желтой звездой отмечены Н-связи с участием Asn204 пептида.

Согласно кристаллической структуре рСН3, которую нам удалось установить с разрешением 3,0 Å (В), молекулы химеры 14-3-3 σ с фосфопептидом LRRNpS²⁰⁵GC-COOH образовывали решетку, сходную с обнаруженной нами в случае рСН1 (Рис. 62А). При такой

укладке соседние димеры 14-3-3 обменивались ковалентно присоединенными фосфопептидами, стабилизируя надмолекулярную сборку (Рис. 64А). Нам удалось выявить все остатки фосфопептида, связанного в АБ 14-3-3 в трех несколько отличающихся конформациях. В одной из конформаций атом азота основной цепи Gly206 в положении +1 по отношению к фосфорилированному Ser205 образовывал Н-связь с фосфатной группой, приводя к некоторому проседанию С-концевой части фосфопептида, а боковая цепь остатка Asn204 образовывала контакт с карбонильным кислородом остатка Leu222 14-3-3 (Рис. 64Б). Во второй – Asn204 давал Н-связь с боковой группой Asp225 14-3-3, и была обнаружена молекула воды, опосредующая контакт Arg202 с фосфатной группой pSer205 (Рис. 64В). В третьем случае конформация фосфопептида не имела перечисленных особенностей (Рис. 64Г) и была сходна с канонической конформацией, например, наблюдаемой в случае пептида белка В6. Во всех трех случаях длинная боковая цепь остатка Lys49 14-3-3 выполняет роль своего рода реостата, обеспечивая во всех случаях разные контакты с фосфопептидом и подстраиваясь под его конкретные конформации. Наибольшие различия наблюдались в области остатка Gly206, который, очевидно, придает повышенную пластичность, приводя к разным положениям основной цепи – от более канонической до согнутой книзу, когда атом азота основной цепи образует водородную связь с фосфатной группой (Рис. 64Б).

Новая структура комплекса 14-3-3 с фосфопептидом ААНАТ подтверждает преимущества использования химерных конструкций на основе 14-3-3 и является недостающим звеном в многолетних исследованиях физиологически значимого взаимодействия между этими белками.

Важнейшим белком-партнером 14-3-3, регулирующим синтез стероидных гормонов в специализированных клетках надпочечников и половых желез, является стероидогенный регуляторный белок STARD1, который отвечает за транспортировку молекул холестерина к внутренней мембране митохондрий, где начинается стероидогенез [534, 536]. Функционирование STARD1 регулируется различными факторами, в том числе при фосфорилировании. По данным литературы, остатки Ser57 и Ser195 в составе STARD1 человека фосфорилируются под действием PKA [542] и расположены в мотивах, узнаваемых белками 14-3-3 [241, 242, 552, 553]. Несмотря на то, что взаимодействие 14-3-3 и STARD1 было исследовано в клетках при регуляции стероидогенеза [241, 242], структурные данные, которые характеризовали бы основные интерфейсы в комплексе этих белков, фактически отсутствовали. В нашей работе были созданы две химерные конструкции на основе 14-3-3σ, одна из которых включала фосфопептид RRSpS⁵⁷LLGSR (pCH4), а другая – RRGpS¹⁹⁵TCVLA

(pCH5). Оба мотива имеют последовательности, субоптимальные с точки зрения связывания с белками 14-3-3, поскольку лишены остатка Pro или Gly в положении +2 относительно pSer, и, по всей видимости, обладают невысоким сродством к амфипатической бороздке 14-3-3. Для таких случаев химеры 14-3-3 могут быть особенно полезны, поскольку обеспечивают полноту связывания.

Кристаллические структуры химер pCH4 и pCH5 были получены с разрешением 2,0 (Рис. 65) и 2,6 Å (Рис. 66), соответственно. Как и в случае остальных химер, описанных выше, кристаллы, пригодные для PCA, были найдены уже при первых попытках кристаллизационного скриннинга, без какой-либо трудоемкой оптимизации.

Последовательность Ser57-фосфопептида STARD1 RRSpS⁵⁷LLGSR почти идентична таковой в фосфопептиде RRSpS⁸⁷LLSRS проапоптотического Bcl-2-подобного белка 11 человека (код Uniprot O43521) и фосфопептиде RRSpS⁴³⁵LLSLM белка 1, взаимодействующего с семейством RAB11 (код Uniprot Q6WKZ4). Это представляется редким случаем среди описанных в литературе партнеров 14-3-3. Помимо STARD1, оба эти белка описаны как взаимодействующие с 14-3-3 [554-556]. Ввиду сходства центральных участков пептидов (подчеркнуты выше), можно ожидать, что полученная нами структура, представленная на Рис. 65, репрезентативна для взаимодействия 14-3-3 сразу с тремя разными белками-партнерами.

При ко-экспрессии белка STARD1 с PKA мы обнаруживали фосфорилирование как Ser57, так и его соседнего остатка, Ser56 (Табл. 24). Такое фосфорилирование соседних остатков может быть неблагоприятным для связывания с АБ 14-3-3 [157, 557]. Поэтому для исследования взаимодействия белков 14-3-3 и STARD1 мы вынуждены были блокировать фосфорилирование полуконсервативного остатка Ser56 (Табл. 24).

В то же время в кристаллической структуре химеры 14-3-3σ с этим пептидом STARD1, фосфорилированной в результате ко-экспрессии с PKA, только остаток Ser57 был фосфорилирован и связан в амфипатической бороздке 14-3-3 (Рис. 65). Остатки RRSpSLL принимают конформацию и дают сложную сеть полярных контактов, которые типичны для пептидных мотивов I типа, с оговоркой, что положение +2 занято неканоническим остатком лейцина, что, как ожидается, делает взаимодействие менее стабильным. Несмотря на относительно высокое разрешение, три С-концевых остатка пептида, GSR, не видны в структуре из-за разупорядоченности, которая может быть следствием недостаточно жесткой фиксации конформации в области Leu +2. В образовании полярных контактов принимает участие несколько молекул воды, также обнаруживается стабилизирующий контакт боковой

цепи остатка Leu58 с гидрофобной стороной амфипатической бороздки 14-3-3 в области остатка Ile219 (Рис. 65).

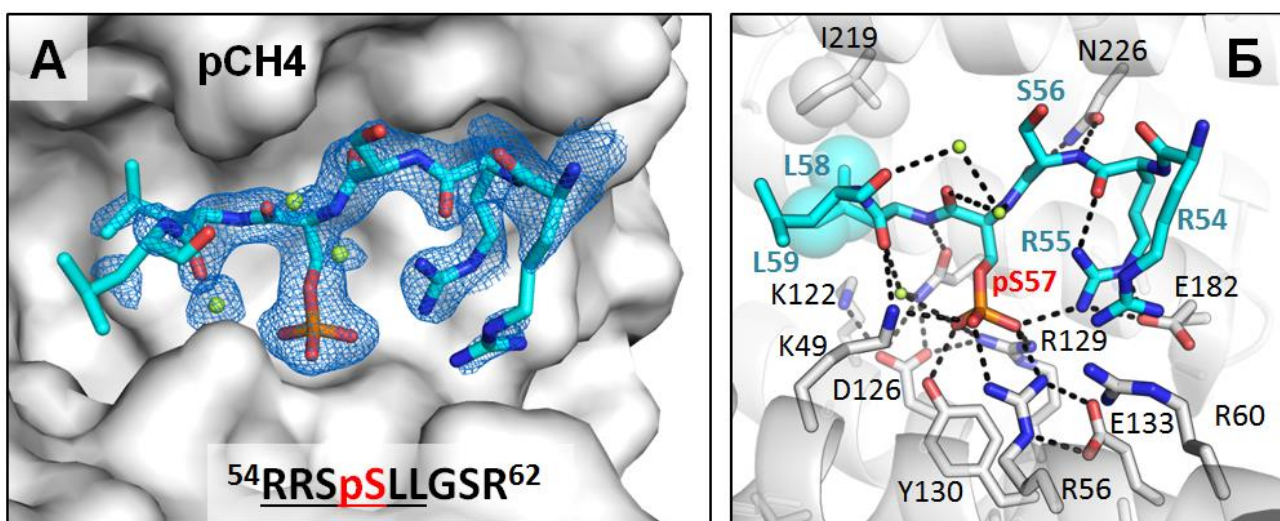


Рис. 65. Кристаллографический интерфейс 14-3-3 σ и Ser57-фосфопептида STARD1 (код PDB 6T5H, разрешение 2,0 Å). А. Конформация пептида (голубой) в АБ 14-3-3 (серая поверхность) показана с картой электронной плотности 2Fo-Fc (контур 1 σ). Молекулы воды отмечены зеленым. Остатки фосфопептида, подтвержденные электронной плотностью, подчеркнуты в последовательности, показанной ниже. Б. Сеть полярных (черный пунктир) и гидрофобных взаимодействий (полупрозрачные сферы), стабилизирующих конформацию пептида в АБ 14-3-3. Ключевые остатки 14-3-3 отмечены простым, пептида – жирным шрифтом (фосфосерин отмечен красным).

Структура химеры с Ser195-фосфопептидом STARD1 еще более примечательна, поскольку в ней в двух мономерах в составе одного димера 14-3-3 фосфопептиды связаны в двух сильно отличающихся конформациях – *вытянутой* и *изогнутой* (Рис. 66). При этом все остатки фосфопептида RRGpS¹⁹⁵TCVLA прослеживаются в картах электронной плотности в обеих конформациях. Вытянутая конформация демонстрирует характерный излом наружу амфипатической бороздки несмотря на то, что Cys197 занимает положение канонического остатка Pro +2, стимулирующего излом в других структурах. Во втором случае пептидная цепь испытывает более кардинальный изгиб и поворот (Рис. 66). Полученное разрешение (2,6 Å) позволяет проследить контакты, стабилизирующие обе конформации. Хотя обе конформации сохраняют контакты, типичные для фосфопептидных взаимодействий 14-3-3, вытянутая конформация представляется более выгодной из-за дополнительных гидрофобных контактов, создаваемых остатками пептида V198-L199 с остатками L218, I219 и V46 со стороны 14-3-3 (Рис. 66).

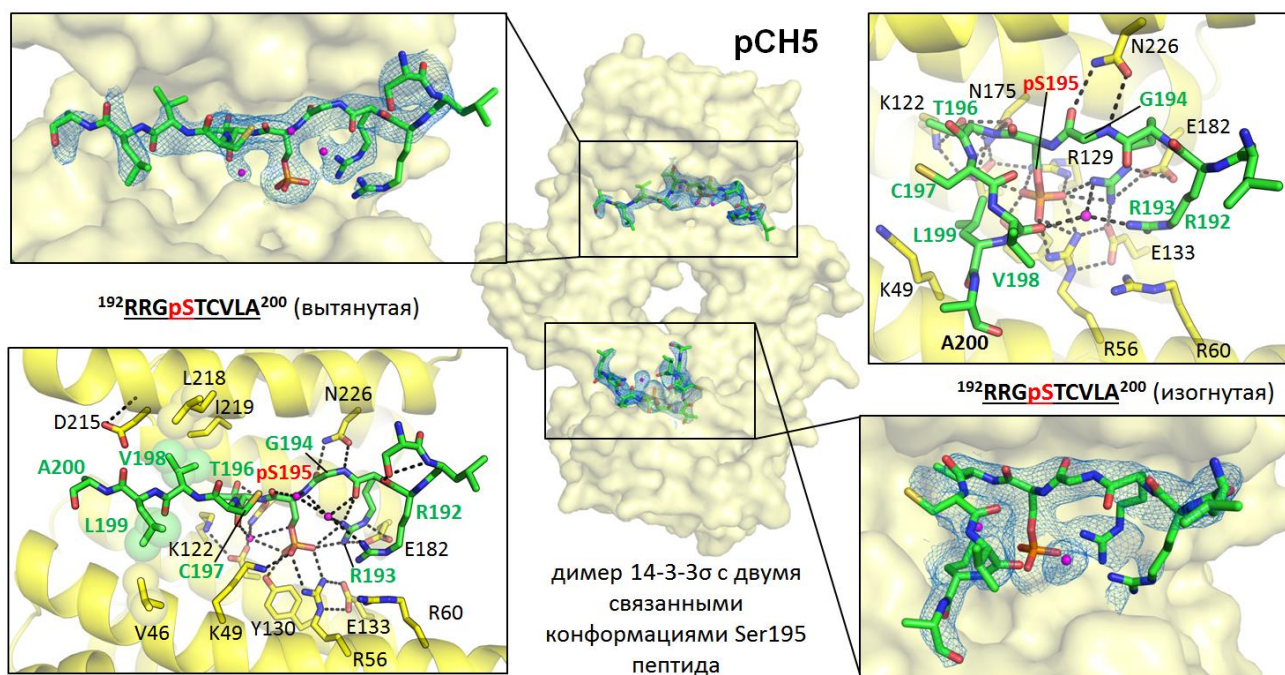


Рис. 66. Кристаллографический интерфейс 14-3-3σ с Ser195-фосфопептидом STARD1 (код PDB 6T5F, разрешение 2,6 Å) в двух разных конформациях (в центре). Слева – связывание вытянутой, справа – изогнутой конформации фосфопептида (зеленый). Электронная плотность 2Fo-Fc, соответствующая фосфопептиду, имеет контур 1σ. Ключевые остатки 14-3-3 помечены простым, а остатки пептида – жирным шрифтом (фосфосерин отмечен красным). Последовательность фосфопептида показана (остатки, подтвержденные картами электронной плотности, подчеркнуты). Гидрофобные контакты с участием С-концевых остатков V198-L199 фосфопептида показаны полупрозрачными сферами.

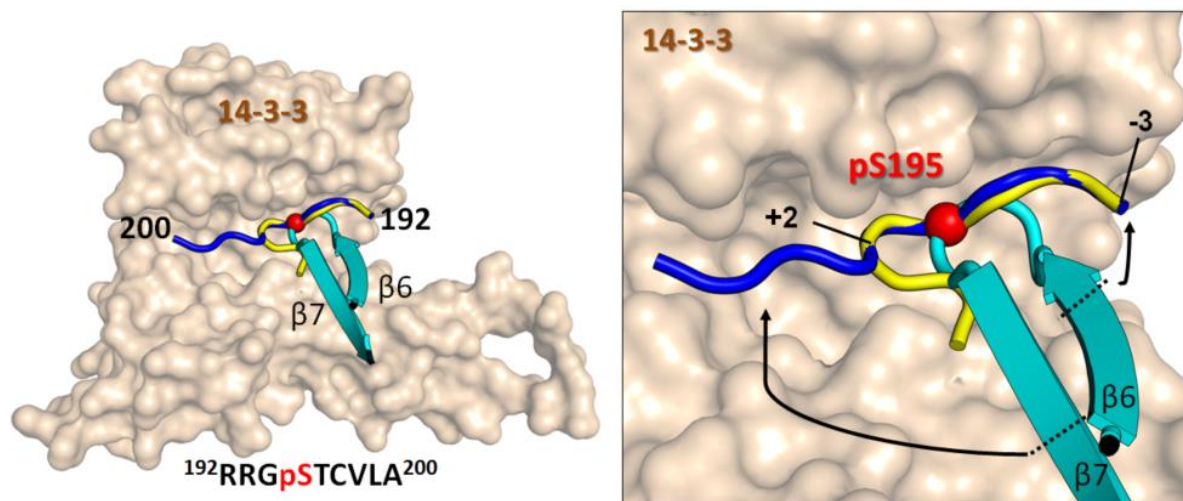


Рис. 67. Сравнение конформации Ser195-фосфопептида STARD1 в свободном и 14-3-3-связанном состоянии. Две конформации фосфопептида, наблюдаемые в комплексе с 14-3-3, совмещены с конформацией этого сегмента в STARD1, где он является частью шпильки β6-β7 (код PDB 3P0L). Слева, общий вид субъединицы 14-3-3 с тремя конформациями Ser195-пептида (разные цвета). Справа – вид крупным планом, показывающий предполагаемое разворачивание (черные стрелки), которое требуется петле β6-β7 для принятия вытянутой конформации. Указаны Cα атомы ключевых 14-3-3-связывающих аминокислот в положениях -3 и +2 относительно центрального фосфосерина (красный).

Наличие двух конформаций одного и того же фосфопептида указывает на его пластичность при связывании с 14-3-3. Более того, соответствующий сегмент в нативном STARD1 представлен жесткой $\beta 6$ - $\beta 7$ шпилькой в составе протяженного β -листа (код PDB 3POL) [541]. Очевидно, что для полноценного связывания в АБ 14-3-3, этот сегмент должен развернуться (Рис. 67), что, по всей видимости, имеет место при функционировании STARD1 и его импорте в митохондрии при стероидогенезе [349, 534, 558, 559]. Ввиду каноничности связывания Ser195-фосфопептида в АБ 14-3-3, можно предположить, что его пластичность определяет так называемое «условное» (conditional) связывание, что уже было показано для некоторых других белков [560], но не для 14-3-3. В противоположность этому, связывание фосфопептида, содержащего остаток Ser57, зависит только от фосфорилирования, то есть в данном смысле не является условным. Согласно такой гипотезе, STARD1 может связываться с 14-3-3, используя оба участка, Ser57 и Ser195, только в случае конформационных перестроек, делающих сегмент в районе Ser195 достаточно пластичным и компетентным к принятию вытянутой конформации в амфипатической бороздке 14-3-3.

3.2.2.4. Преимущества и недостатки химер на основе 14-3-3 σ

Таким образом, нам удалось использовать сочетание преимуществ системы ко-экспрессии с РКА и химерных конструкций на основе 14-3-3 и разработать успешный подход, облегчающий получение структурной информации о комплексах 14-3-3 с фосфопептидами белков-партнеров. Такой подход гарантирует 1:1 стехиометрию комплексов и, в отличие от использования синтетических фосфопептидов, не имеет ограничений, вызванных их низкой растворимостью, низким сродством к 14-3-3 или недостаточной полнотой связывания, которая обычно выражается в частичной заселенности конформации пептида в АБ 14-3-3 или в том, что в картах электронной плотности обнаруживаются всего несколько остатков аминокислот, расположенных непосредственно вблизи фосфо-сайта. Таких примеров довольно много в литературе даже для пептидов, которые демонстрируют высокую аффинность к 14-3-3 [144, 292, 561]. В некоторых случаях авторы даже признаются, что кристаллизация комплекса 14-3-3 с высокоаффинным фосфопептидом была невозможной, несмотря на многочисленные попытки [144]. Полученные нами химеры были закристаллизованы в нескольких формах – с фосфопептидами, связанными в АБ тех же субъединиц, к которым были ковалентно присоединены (Рис. 62Г), с фосфопептидами, перекрестно связанными в соседних димерах 14-3-3 (например, Рис. 62А, Рис. 64 и Рис. 65), а также с фосфопептидами, связывание

которых приводило к образованию циклических структур с димерами-партнерами по кристаллографической симметрии (Рис. 63). Во всех случаях была достигнута цель, и получены атомные структуры различного разрешения. Для некоторых случаев было показано, что конформация фосфопептида не отличалась от таковой, полученной при использовании синтетического фосфопептида. Можно с уверенностью сказать, что вариации кристаллических форм, в сочетании с мутациями, снижающими поверхностную энтропию (Рис. 40), значительно увеличивают шансы на получение необходимой структурной информации.

Большим преимуществом «химерного» подхода является модульность и гибкость, при которых любой элемент может быть оптимизирован и модернизирован. Например, допускается смена протеинкиназы или изоформы 14-3-3, а также последовательности, присоединенной к С-концу 14-3-3, если фосфорилируемый остаток находится на определенном расстоянии от начала линкера, чтобы обеспечить его корректное связывание в амфипатической бороздке 14-3-3. Для фосфорилируемых последовательностей, для которых ко-экспрессия с нужной протеинкиназой невозможна, предполагается очистка нефосфорилированной формы химеры и ее последующее фосфорилирование с соответствующей протеинкиназой *in vitro*, например, с использованием коммерческих препаратов протеинкиназы. Предполагается, что разработанный подход может масштабироваться путем создания библиотек химер с различными пептидами и их последующей очистки и кристаллизации в высокопоточном формате. Такой подход представляется востребованным для поиска новых партнеров 14-3-3, а также валидации вновь идентифицированных взаимодействий, для которых отсутствует структурная информация. Область потенциального применения простирается еще дальше, поскольку предложенные химерные конструкции на основе 14-3-3 могут быть использованы для создания биосенсоров на протеинкиназную активность или для тестирования низкомолекулярных модуляторов комплексов 14-3-3. В последнее время в литературе действительно появляются данные об использовании химер 14-3-3 для решения подобных задач [562-565]. Выявленные нами особенности фосфорилированных форм химер 14-3-3, такие как компактизация и повышение термостабильности (Рис. 61), вероятно, могут быть использованы при проверке правильности сборки химер до начала кристаллизационного скриннинга, а также при тестировании эффектов низкомолекулярных модуляторов взаимодействий в амфипатической бороздке 14-3-3.

Разработанный химерный подход может быть далее применен для различных частных задач в сфере исследования комплексов 14-3-3. Например, пользуясь ковалентным присоединением С-конца 14-3-3 к N-концу взаимодействующего с ним партнера можно перейти к исследованию комплексов с полноразмерными белками-партнерами, в которых фосфорилированные участки находятся в разупорядоченном N-концевом сегменте. Важно отметить, что такое расположение 14-3-3-связывающих участков является довольно типичным. Наглядным примером такого белка является детально охарактеризованный нами HSPB6. Описанные нами до сих пор химеры были основаны на 14-3-3 σ , которая является наиболее представленной изоформой в PDB и, по-видимому, лучше остальных кристаллизуется. Однако 14-3-3 σ имеет наименьшее число белков-партнеров (Табл. 5) и не образует гетеродимеры с другими изоформами 14-3-3 [73, 106, 114, 116, 122], поэтому ее дальнейшее использование может быть ограниченным. При использовании гетеродимеров 14-3-3, в которых мономеры представляли бы собой химеры с разными фосфопептидами одного или разных белков-партнеров, было бы возможно получить уникальную структурную информацию о тройных комплексах для проверки гипотезы об адаптерной роли белков 14-3-3. Для этого представляется целесообразным разрабатывать и применять химерные конструкции на основе таких изоформ, как, например, 14-3-3 γ , 14-3-3 ϵ или 14-3-3 ζ .

Линкерная область химер 14-3-3 с фосфопептидами может и должна быть усовершенствована. Параллельно с корректной структурой химеры с фосфопептидом STARD1 в области остатка Ser57 (Рис. 65) нами также была получена структура с разрешением 3,9 Å, в которой два соседних димера взаимодействовали с АБ друг друга за счет необычных контактов с участием фосфопептидов (Рис. 68). Несмотря на низкое разрешение, упаковка молекул и карты электронной плотности однозначно показали связывание в АБ сегмента линкера, неспецифически фосфорилированного по второму остатку Ser (-GSGpS-) (Рис. 68). В одной из цепей прослеживалось положение трех остатков LRR за пределами этого фосфосерина, что указывало на обратную ориентацию связанного пептида pSLRR по сравнению с наблюдаемыми для остальных структур химер и пептидных комплексов 14-3-3 (RRXpS) (см. Рис. 7). Ранее обратная ориентация цепи пептида наблюдалась только в случае нефосфорилированных пептидов EchoS [295, 566] и R18 [143], имеющих другой принцип взаимодействия с АБ 14-3-3 за счет наличия чередующихся отрицательно-заряженных и гидрофобных остатков, однако никогда прежде не была задокументирована для фосфорилированных пептидов.

Такая картина иллюстрирует чрезвычайно редкий случай, когда пептид, фосфорилированный РКА в неканоническом положении (N-..pSXXR..-C вместо N-..RXXpS..-C), был ошибочно связан в АБ 14-3-3 в нестандартной, противоположной ориентации. Это может быть артефактом, вызванным относительно высоким уровнем экспрессии РКА, снижающим специфичность фосфорилирования, хотя в подобных условиях этого не происходило с химерами рСН1-рСН3 и рСН5, где один и тот же линкер оставался нефосфорилированным. В этой связи, чтобы исключить неспецифическое фосфорилирование, следует избегать остатка серина в линкере GSGS. Полученная «ошибочная» структура иллюстрирует отсутствие жесткой строгости канавки 14-3-3 при связывании лигандов. В данном случае также наблюдалась максимально раскрытая конформация одной из субъединиц 14-3-3, что создало сложности при решении структуры. При этом такая раскрытая конформация не препятствовала связыванию сульфат-иона из среды кристаллизации (Рис. 68, желтая субъединица), что согласуется с наблюдениями о пластичности и конформационной лабильности субъединицы 14-3-3, описанными выше (Рис. 37).

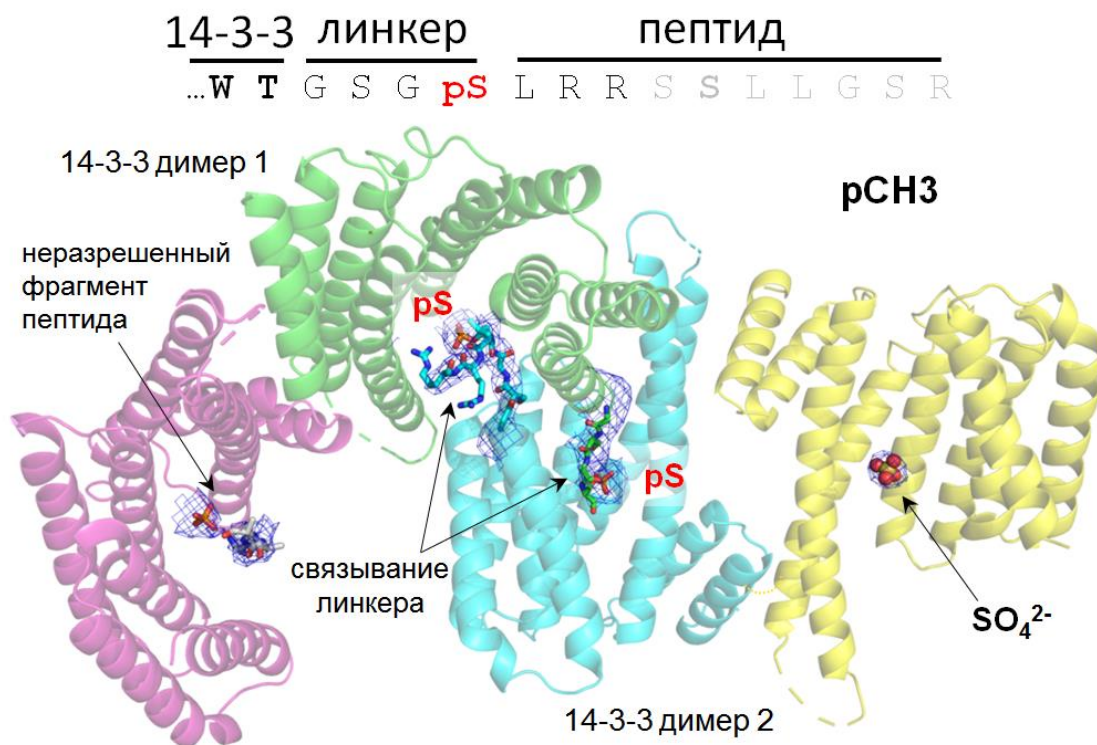


Рис. 68. Фосфорилирование серина в линкере GSGS может приводить к неправильной упаковке кристаллов химер 14-3-3σ. Показано на примере кристаллической структуры химеры 14-3-3σ с пептидом белка STARD1 в области остатка Ser57 (код PDB 5OMA, разрешение 3,9 Å). Последовательность С-концевой области химеры приведена сверху. Для всех лигандов, связанных в АБ, показана карта электронной плотности 2Fo-Fc с контуром 1σ. Свободные субъединицы 14-3-3 связывают в своих АБ неразрешенный фрагмент фосфопептида и сульфат-ион.

3.2.2.5. Химерная конструкция 14-3-3ζ с фосфопептидом проапоптотического белка BAD человека

Для подтверждения применимости химерного подхода для других изоформ 14-3-3, новую химеру мы сконструировали на основе 14-3-3ζ, поскольку, в отличие от 14-3-3σ, 14-3-3ζ имеет максимальное число белков-партнеров (Табл. 5), способна гетеродимеризоваться с другими изоформами 14-3-3 и имеет преимущество при сборке и структурных исследованиях тройных комплексов. Для того чтобы заблокировать фосфорилирование остатка Ser58, находящегося в интерфейсе субъединиц 14-3-3ζ, в это положение был введен остаток аланина, как в 14-3-3σ, исходно устойчивой к фосфорилированию под действием PKA (Рис. 53). Кроме того, для облегчения кристаллизации за счет снижения поверхностной энтропии [355, 475] в каркас 14-3-3ζ были введены аминокислотные замены ¹⁵⁷KKE¹⁵⁹ → AAA (кластер 2, Clu2), эквивалентные тем, которые оказались успешными с 14-3-3σ конструкциями (Рис. 69).

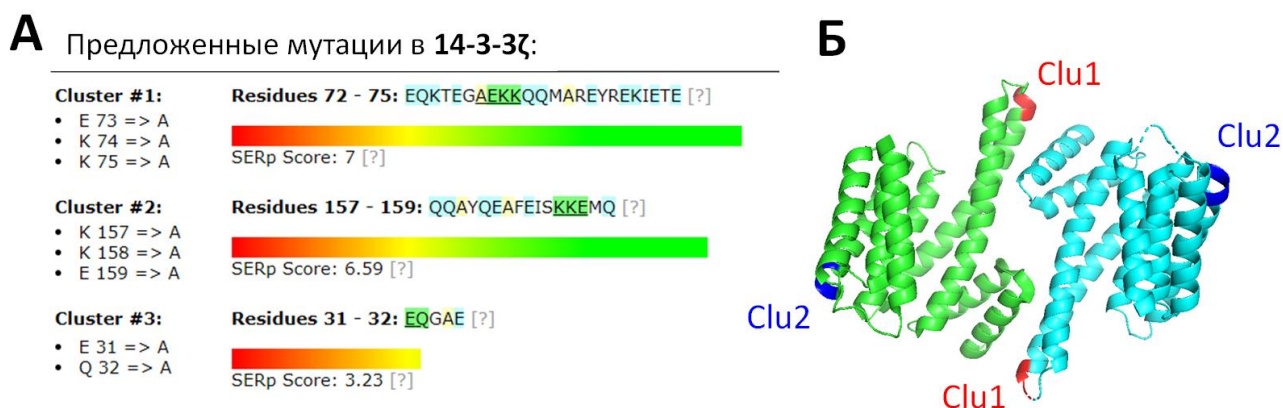


Рис. 69. Анализ наличия в последовательности 14-3-3ζ человека участков с повышенной поверхностной энтропией с целью их замены для повышения кристаллизуемости. А. Результаты предсказания по данным сервера *Surface Entropy Reduction* [355, 475], которые показывают наличие в 14-3-3ζ трех кластеров повышенной поверхностной энтропии (Cluster 1-3, в порядке снижения перспективности замены). Б. Расположение найденных участков в структуре 14-3-3ζ. Кластер 3 был проигнорирован ввиду низкого значения score. Два других кластера были использованы для введения аланиновых замен Clu1 и Clu2.

В качестве партнера мы выбрали фосфопептид SRHSpSYAGTE проапоптотического белка BAD, содержащий остаток Ser75 (номер остатка соответствует последовательности BAD человека и эквивалентен Ser112 BAD мыши). BAD является хорошо известным партнером 14-3-3, фосфорилируемым по нескольким положениям киназами PKA [567], PAK1 [568], PKB/Akt [569, 570] и RSK1 [571]. Фосфорилированный BAD удерживается белком 14-3-3 в цитоплазме до тех пор, пока проапоптотические сигналы не разрушат его комплекс с 14-3-3, высвобождая BAD и позволяя ему транслоцироваться к

митохондриальной мембране и, связываясь с другими членами BCL-2 семейства белков, запускать апоптоз [572, 573]. Таким образом, комплекс 14-3-3/BAD представляет собой точку баланса про- и антиапоптотической регуляции [221, 572, 574-580] и, следовательно, привлекательную мишень для разработки методов терапии в широком спектре патологических состояний [581-584]. Удивительно, но несмотря на огромное биомедицинское значение, структура комплекса 14-3-3/BAD до сих пор не была решена, что, вероятно, связано с неупорядоченной структурой BAD [585].

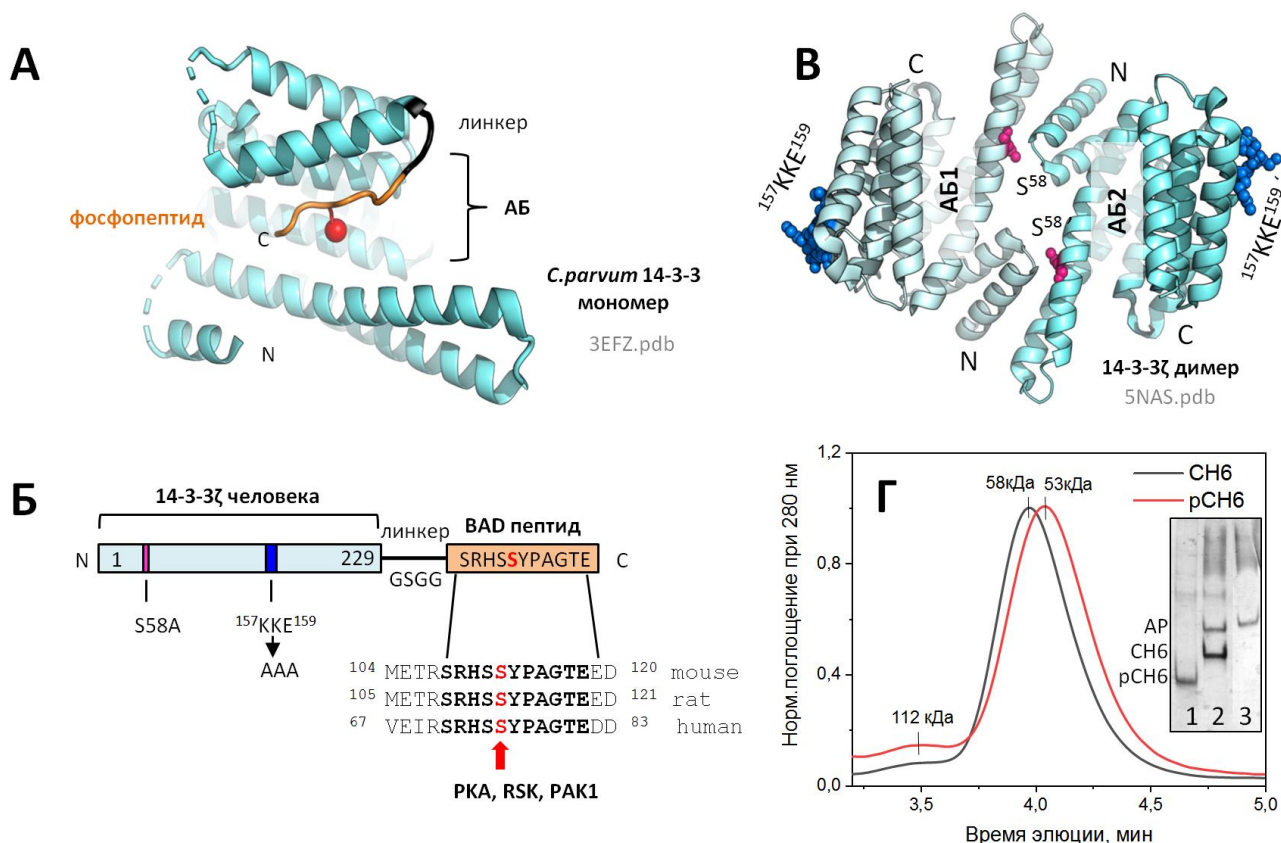


Рис. 70. Дизайн химеры 14-3-3ζ с фосфопептидом от проапоптотического белка BAD (CH6). А. Кристаллическая структура фосфорилированного 14-3-3 из *S. parvum*, использованная как прототип. Остаток фосфата показан красной сферой, АБ обозначает амфипатическую бороздку. Б. Модульность химеры, состоящей из бестаговой последовательности 14-3-3ζ человека (остатки 1-229) и консервативного фосфопептида BAD в области остатка Ser75 (нумерация BAD человека), соединенного с ядром 14-3-3 через линкер GSGG. Последовательность 14-3-3ζ модифицирована для блокирования фосфорилирования Ser58 под действием PKA и для облегчения кристаллизации. Локальное выравнивание сегментов BAD мыши, крысы и человека, на котором отмечен консервативный остаток серина, который фосфорилируется различными протеинкиназами (указаны). В. Ленточная диаграмма димера 14-3-3ζ человека, показывающая расположение модифицированных положений в ядре 14-3-3. AB1 и AB2 обозначают две идентичные амфипатические бороздки 14-3-3, где связываются фосфопептиды. Г. Профили ГФ с колонки Superdex 200 Increase 5/150 для фосфорилированной и нефосфорилированной химеры CH6, на которых отмечены максимумы пиков с соответствующими кажущимися массами, определенными из калибровки. На вставке показана электрофореграмма в нативных условиях: pCH6 (1) была дефосфорилирована (2) при добавлении щелочной фосфатазы (AP). В контроле нанесена сама AP (3).

Ядро 14-3-3 ζ (остатки 1-229) было соединено с пептидом BAD с использованием гибкого линкера такой же длины, как в случае химер на основе 14-3-3 σ и белка 14-3-3 из *S.parvum* (Рис. 70А-В). Однако в данном случае мы использовали линкер из остатков GSGG для того, чтобы исключить фосфорилирование второго остатка серина (Рис. 70Б). Новая химера СН6 не содержала тагов для аффинной очистки, чтобы в дальнейшем иметь возможность комбинировать ее с химерами на основе других изоформ при сборке гетеродимерных химер. Пептид BAD включал 11-членный сегмент, консервативный у человека, мыши и крысы (Рис. 70Б). Фосфорилирование пептида BAD происходило за счет ко-экспрессии химеры с РКА (pСН6), однако для сравнения также был получен вариант без РКА (СН6).

В отсутствие тагов оба варианта химеры были очищены до высокой степени чистоты с помощью комбинации высаливания сульфатом аммония и колоночной хроматографии. Сравнение профилей ГФ для СН6 и pСН6 позволило выявить сдвиг пика, соответствующий компактизации химеры в результате связывания фосфопептидов BAD в амфипатических бороздках 14-3-3 (Рис. 70Г), как это ранее наблюдалось для СН1 химеры (Рис. 61). Дефосфорилирование очищенной pСН6, которая была ко-экспрессирована с РКА, под действием щелочной фосфатазы подтвердило, что pСН6 является фосфорилированным белком (Рис. 70Г, вставка). Кристаллизация химеры pСН6 оказалась эффективной, так как кристаллы появились в различных химических средах (Рис. 71). Размеры и формы кристаллов позволяли предположить, что по крайней мере некоторые из них являются хорошими кандидатами для РСА.

Таким образом, мы смогли убедиться, что ядро 14-3-3 ζ может быть использовано так же эффективно, как и 14-3-3 σ , для дальнейшего использования «химерного» подхода. В дальнейшем, чтобы сделать фосфорилирование сайт-направленным и не лимитированным специфичностью доступных протеинкиназ, представляется перспективным сочетание химерного подхода с системами ко-трансляционного включения остатков серина за счет технологии расширения генетического кода (genetic code expansion, GCE) [532]. Этот подход может быть максимально полезным для фосфопептидов, содержащих более одного фосфорилируемого сайта, например, как в случае пептида BAD (SRHSSYPAGTE), а также в случае, если соответствующая протеинкиназа недостаточно специфична или недоступна. Это позволит уменьшить гетерогенность, связанную с фосфорилированием, и сделает получаемые химерные фосфобелки перспективным объектом для структурных исследований.

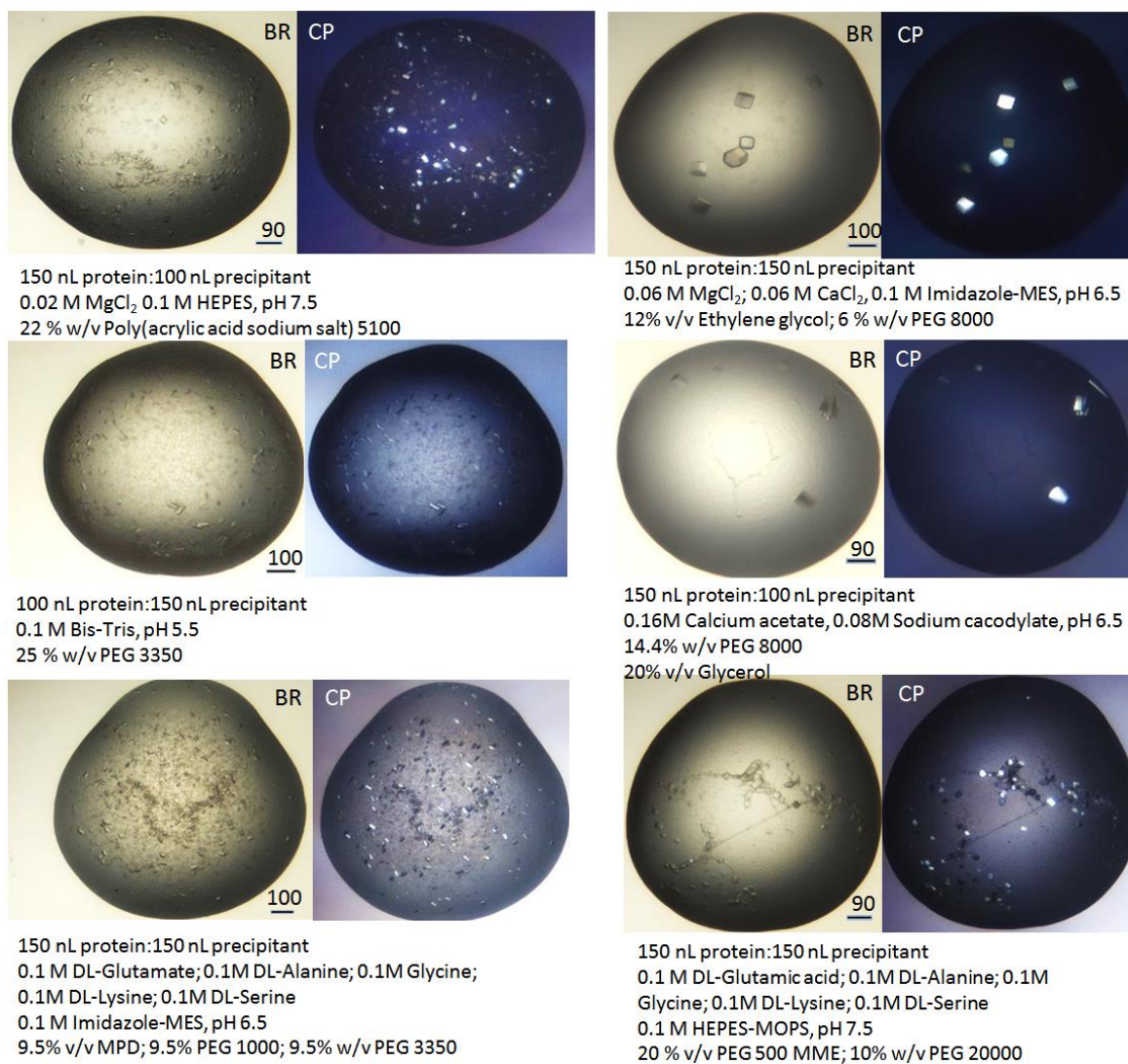


Рис. 71. Химера 14-3-3ζ с фосфопептидом VAD (CH6) легко кристаллизуется в различных условиях при 4 °С. Шесть капель показаны в качестве примера с точными условиями, приводящими к кристаллизации. Одни и те же капли изображены в двух режимах: BR, светлое поле; CP, кроссполяризатор. Шкала показана для каждой капли (в μм).

3.2.2.6. Исследование механизма взаимодействия 14-3-3ζ с фосфопептидами онкобелка Е6 вируса папилломы человека с применением химерных конструкций

Отработав дизайн химер на основе 14-3-3ζ, мы перешли к решению с их помощью фундаментальной задачи. По данным литературы, 14-3-3ζ является партнером онкобелка Е6 вируса папилломы человека (HPV) [261, 262]. Этот белок экспрессируется вскоре после инфекции и ускоряет протеасомо-зависимую деградацию p53 и других проапоптотических белков клетки-хозяина, которую инфицирует HPV [586, 587]. Такой подрыв работы проапоптотической системы провоцирует развитие многих видов рака, в том числе, рака шейки матки – основной причины смертности женщин во всем мире [588, 589]. Было показано взаимодействие 14-3-3ζ с белком Е6 одного из наиболее распространенных подтипов высокого риска развития рака, HPV18 («18Е6») [261]. Ингибирование Е6 останавливает рост клеток и вызывает апоптоз или быстрое старение [590], что делает этот белок центральным игроком развития HPV инфекции и привлекательной мишенью для ее искоренения [591, 592].

Важно, что за связывание с 14-3-3 отвечает С-концевой мотив белка Е6, так называемый PDZ-домен-связывающий мотив (PBM) (Рис. 72А), который присутствует преимущественно у Е6 из подтипов HPV высокого риска развития рака, поражающих слизистые оболочки, и практически отсутствует в белках Е6 подтипов HPV низкого риска, поражающих кожный эпителий [262, 593].

В зависимости от фосфорилирования под действием базофильных киназ (например, PKA и PKB/Akt [261, 262, 594, 595]), структурно-разупорядоченный PBM белков Е6 способен связываться либо с PDZ-доменами белков клетки хозяина (когда нефосфорилирован), либо с белками 14-3-3 (когда фосфорилирован) [261]. Е6 PBM из HPV типов 16 и 18 (Рис. 72Б), поражающих слизистую оболочку и имеющих высокий риск развития рака, являются хорошими субстратами PKA *in vitro* и *in vivo* [261, 262, 595]. При этом фосфорилирование происходит в последовательностях, которые отвечают консенсусным мотивам III связывания с белками 14-3-3 [35, 138].

Фосфорилирование PBM в составе Е6 может действовать как переключатель, который снижает сродство к PDZ-доменам, но способствует связыванию фосфорилированных PBM с белками 14-3-3 [261, 262, 596]. Аналогичное переключение было показано для С-концевого мотива PBM фермента PRMT5 (RSYpTIGL-COOH), что определяет его связывание с 14-3-3 [597]. Однако молекулярный механизм взаимодействия 14-3-3 с С-концевым пептидом белков Е6 требовал тщательного количественного и структурного описания.

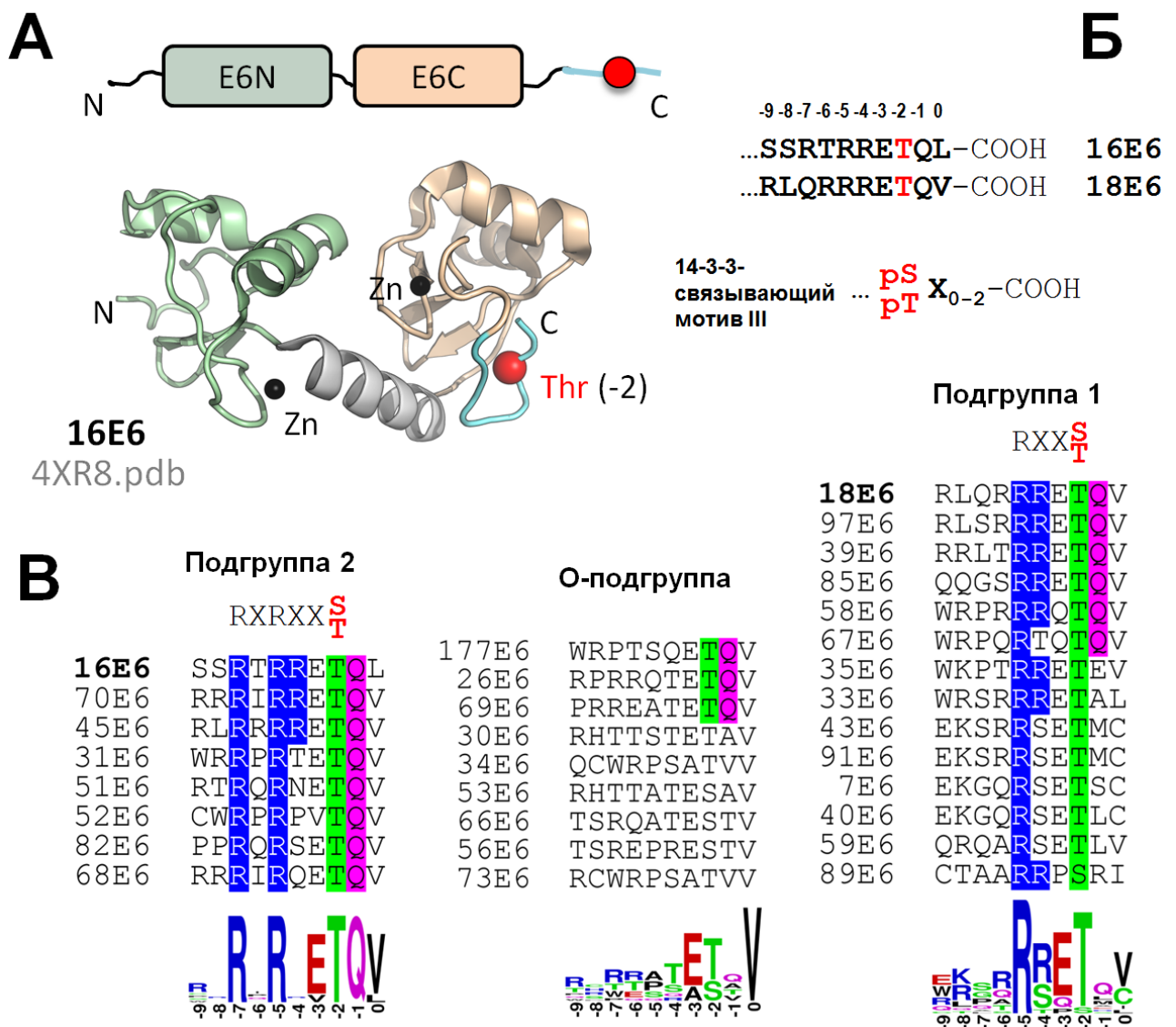


Рис. 72. Особенности структуры белка E6. А. Доменная организация (вверху) и трехмерная структура (внизу) белка HPV16 E6 (16E6), показывающая расположение фосфорилируемого PDZ-связывающего мотива (PBM). N-концевой (E6N) и C-концевой (E6C) домены имеют цветовую кодировку, структурные атомы Zn выделены черным, PBM – голубым, фосфорилируемый остаток Thr в положении -2 PBM – красным. Б. PBM белков E6 из HPV двух основных типов высокого риска развития рака, поражающих слизистую оболочку, перекрываются с 14-3-3-связывающим мотивом III. Положения пронумерованы выше, в соответствии с нумерацией, принятой для PBM. В. Классификация 31 PBM-содержащих белков E6 HPV на основе соответствия их C-концевых PBM консенсусным мотивам, фосфорилируемым с помощью базофильных киназ (подгруппы 1 и 2). Третья, о-подгруппа включает PBM белков E6 HPV, фосфорилирование которых неизвестно. Жирный шрифт указывает на E6 PBM, используемые в этой работе. Многие сайты PBM соответствуют мотивам узнавания (S/TQ) для фосфорилирования ATM/ATR киназами в ответ на повреждения ДНК (сайты TQ и SQ выделены). Ниже показаны Weblogo [442] диаграммы для PBM в каждой из трех подгрупп (позиции пронумерованы, как принято для PBM).

PDZ-связывающие мотивы белков E6 могут быть классифицированы в соответствии с их фосфорилированием и склонностью к связыванию с белками 14-3-3.

Среди всех 225 белков E6 HPV типа, курируемых в специализированной базе данных папилломавирусных белков PaVE [598], 31 белок E6 из α -родов HPV, имеющий преимущественно тропизм к слизистым оболочкам, обладает С-концевым PDZ-связывающим мотивом (PBM), который соответствует так называемому классу 1, имеющему консенсусную последовательность X(S/T)X(L/V/I)#, где X – любой аминокислотный остаток и # – С-концевая карбоксильная группа [599]. PBM класса 1 могут фосфорилироваться. Учитывая консенсусные мотивы RXXS/T и RXRXXS/T для базофильных киназ, мы обнаружили, что 31 вариант E6 PBM может быть классифицирован на три подгруппы: подгруппы 1 и 2, имеющие последовательности, склонные к фосфорилированию этими киназами, и третья, о-подгруппа (O – orphan) с менее ясной склонностью к фосфорилированию (Рис. 72В).

В соответствии с более ранними наблюдениями [261, 596, 597], последовательности фосфорилированных PBM идеально соответствуют С-концевому 14-3-3-связывающему мотиву III [35, 138] (Рис. 72Б и В). Действительно, согласно предсказанию, выполненному алгоритмом, реализованным в веб-сервере *14-3-3-Pred* [153], ожидается, что многие PBM из подгрупп 1 и 2 должны взаимодействовать с 14-3-3, тогда как PBM из третьей, о-подгруппы – в основном маловероятные претенденты (Табл. 25). С точки зрения склонности к связыванию с 14-3-3, PBM в подгруппе 1, в общем, имеют более высокую оценку по сравнению с PBM в подгруппе 2. Таким образом, предсказания *14-3-3-Pred* [153], подтверждают классификацию, основанную на соответствии консенсусным мотивам фосфорилирования (Рис. 72В). Если такие оценки верны, то фосфопептид 18Е6 должен обладать более высоким сродством к 14-3-3, чем 16Е6.

Примечательно, что помимо высокой вероятности фосфорилирования с помощью базофильных киназ, таких как PKA, PKG, Chk1, MK2 и САМК (консенсус RXXS/T) или PKB/Akt и RSK1 (консенсус RXRXXS/T), все PBM из подгруппы 2 и почти половина PBM из подгруппы 1 также имеют потенциальные сайты фосфорилирования АТМ/АТР киназ, реагирующих на повреждения ДНК [600] (Рис. 72В). Эти данные подтверждают идею о том, что фосфорилирование широко распространенных С-концевых мотивов PBM различными протеинкиназами может инициировать их узнавание белками 14-3-3.

Чтобы лучше это понять, мы синтезировали два фосфопептида, 16Е6 и 18Е6, которые являются характерными представителями подгрупп 1 и 2 (Рис. 72В) и наиболее часто встречающихся подтипов HPV высокого риска, и проанализировали их взаимодействие с изоформами 14-3-3 человека *in vitro*.

Табл. 25. Предсказание склонности к связыванию 14-3-3 для тридцати одного С-концевого пептида Е6, рассчитанное веб-сервером *14-3-3-Pred* [153]. *подгруппы 1 и 2 фосфорилируются с помощью базофильных киназ, распознающих мотивы RXXS/T и RXXRXXS/T, соответственно, о – подгруппа с неопределенным фосфорилированием; жирным подчеркнутым шрифтом отмечены пептиды Е6, исследованные в нашей работе; **Общая оценка рассчитанная в *14-3-3-Pred* (чем выше, тем более вероятно связывание 14-3-3, пороговое значение равно 0,5 – отделено жирной чертой).

Подгруппа*	Тип HPV	Фосфосайт	Мотив связывания 14-3-3	Общая оценка**
1	59	158	RQARSEtLV--	1,054
2	45	156	LRRRREtQV--	1
1	58	147	RPRRRQtQV--	0,942
2	82	149	PRQRSEtQV--	0,913
1	40	152	KGQRSEtLC--	0,9
1	33	147	RSRRREtAL--	0,887
1	43	153	KSRRSEtMC--	0,885
1	91	153	KSRRSEtMC--	0,885
1	18	156	LQRRREtQV--	0,841
1	39	156	RLTRREtQV--	0,8
1	97	156	LSRRREtQV--	0,8
2	70	156	RRIRREtQV--	0,762
1	35	147	KPTRREtEV--	0,688
1	7	152	KGQRSEtSC--	0,616
2	51	149	TRQRNEtQV--	0,586
1	89	148	TAARRPsRI--	0,568
2	16	149	SRTTRREtQL--	0,562
o	34	146	CWRPSAtVV--	0,529
o	73	146	CWRPSAtVV--	0,529
1	85	155	QGSRRREtQV--	0,52
1	67	147	RPQRTQtQV--	0,478
2	68	156	RRIRQEtQV--	0,459
2	31	147	RRPRTEtQV--	0,412
o	26	148	PRRQtEtQV--	0,105
o	56	153	SREPREsTV--	-0,155
o	69	149	RREATEtQV--	-0,241
o	53	152	HTTATEsAV--	-0,271
o	66	153	SRQATEsTV--	-0,293
o	30	151	HTTSTEtAV--	-0,326
o	177	147	RPTSQEtQV--	-0,545

Взаимодействие пептидов 18Е6 и 16Е6 с изоформами 14-3-3. Для оценки сродства С-концевых пептидов онкобелков Е6 к изоформам 14-3-3 мы воспользовались методом поляризации флуоресценции. В качестве репортера был использован синтетический фосфопептид белка HSPB6, меченный флуоресцеином. Вначале мы выполнили прямое титрование 14-3-3 (10 μM) этим пептидом (диапазон конечных концентраций составил 0-60 μM) и получили кривые титрования, позволившие с помощью квадратичного уравнения [368] оценить константы диссоциации комплексов. На Рис. 73 представлены данные для 14-3-3 γ ($K_D = 1,95 \mu\text{M}$), 14-3-3 ζ ($K_D = 4,76 \mu\text{M}$) и 14-3-3 σ ($K_D = 9,62 \mu\text{M}$). Стоит отметить, что флуоресцентное мечение репортерного пептида HSPB6 не повлияло на его взаимодействие с 14-3-3, поскольку полученные значения констант диссоциации согласовывались с таковыми для γ ($K_D = 2,3 \mu\text{M}$), ζ ($K_D = 5,0 \mu\text{M}$) и σ ($K_D = 6,3 \mu\text{M}$), по данным ИТК с использованием немеченного фосфопептида (Рис. 35Б-Г). Для остальных изоформ 14-3-3 связывание репортерного пептида происходило также в микромолярном диапазоне: β ($K_D = 5,22 \mu\text{M}$), ϵ ($K_D = 7,17 \mu\text{M}$), η ($K_D = 2,47 \mu\text{M}$) и τ ($K_D = 9,0 \mu\text{M}$). Это позволило провести титрование в режиме конкурентного связывания, когда к эквимолярной смеси 14-3-3 и репортерного пептида добавляли раствор немеченного нефосфорилированного или фосфорилированного пептида 18Е6 или 16Е6 (Рис. 73). При таком титровании фитирование с целью определения значений K_D проводили с помощью кубического уравнения [369]. Как ожидалось, титрование нефосфорилированными вариантами обоих пептидов Е6 не привело к изменению сигнала поляризации репортера, поскольку его вытеснения из комплекса с 14-3-3 не происходило. Однако в случае обоих фосфорилированных пептидов мы наблюдали характерное концентрационно-зависимое снижение исходного значения поляризации флуоресценции для всех изоформ 14-3-3, что свидетельствовало о вытеснении репортера увеличивающимися концентрациями фосфорилированных немеченных пептидов (Рис. 73). На Рис. 73 приведены данные титрования для трех изоформ 14-3-3, при этом все значения K_D , определенные в этих экспериментах, сведены в Табл. 26.

В этих экспериментах мы подтвердили, что фосфорилирование РВМ белков Е6 принципиально важно для их узнавания белками 14-3-3. При этом фосфопептиды 16Е6 и 18Е6 демонстрировали разные профили аффинности к 14-3-3 – в случае всех семи изоформ 14-3-3 человека мы наблюдали в 3-4 раза более прочное связывание фосфопептида 18Е6 (Табл. 26). Это хорошо согласуется с предсказанием, выполненным с помощью сервера *14-3-3-Pred* (Табл. 25), и означает, что минимальные различия в последовательностях пептидов 16Е6 и 18Е6 транслируются в существенные различия в их аффинности к 14-3-3.

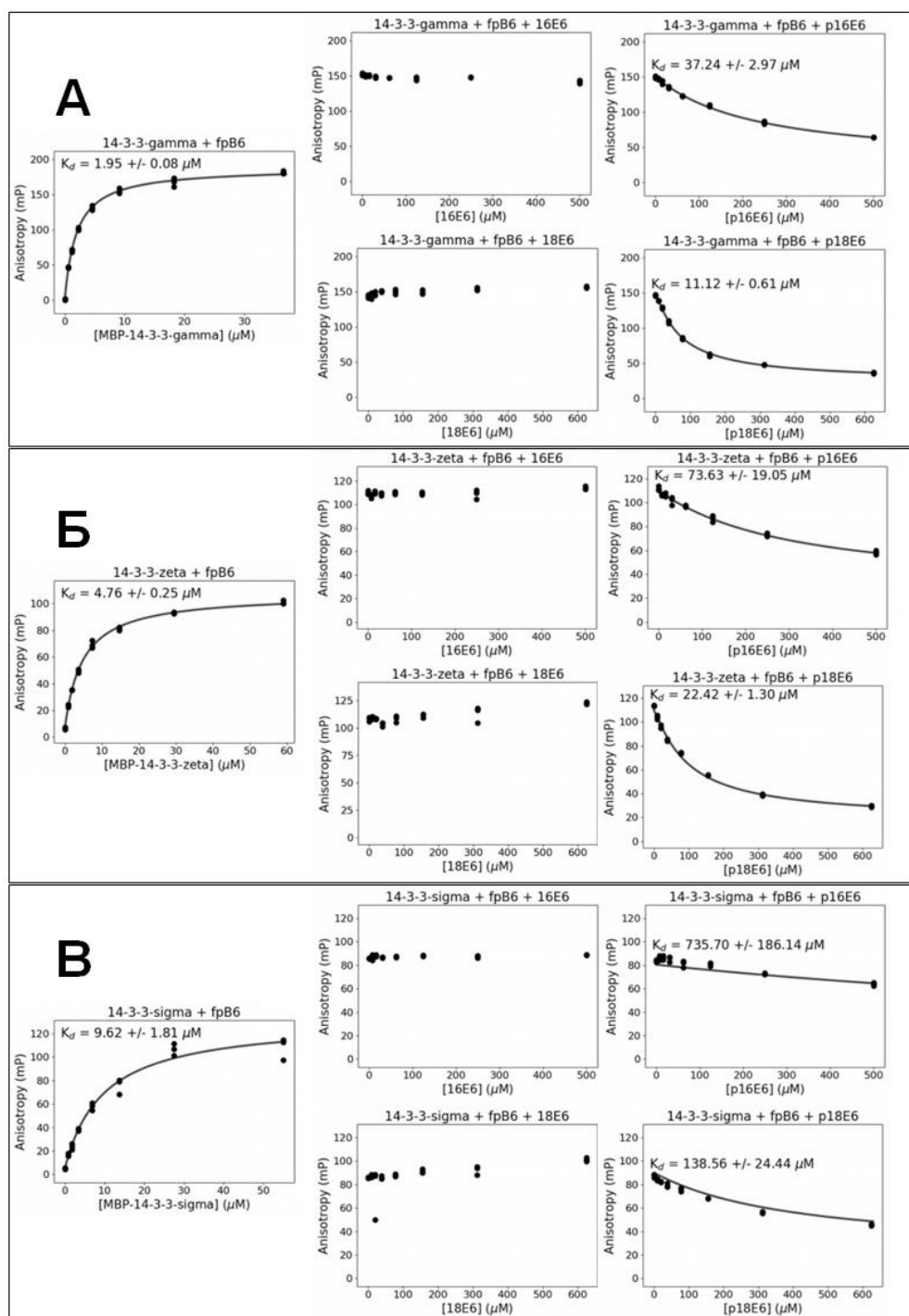


Рис. 73. Измерение прочность связывания пептидов 16Е6 и 18Е6 с 14-3-3 γ (А), 14-3-3 ζ (Б) и 14-3-3 σ (В) с помощью поляризации флуоресценции. Три панели в левом столбце представляют собой кривые прямого титрования изоформ 14-3-3 фосфопептидом В6, меченным флуоресцеином (fpВ6). Остальные панели соответствуют конкурентному титрованию, при котором смесь 14-3-3 с fpВ6 титровалась пептидами 16Е6 (верхние ряды) и 18Е6 (нижние ряды) в нефосфорилированном (средний столбец) или фосфорилированном состоянии (правый столбец). Представлены результаты фитирования полученных кривых с помощью квадратичного (прямое титрование) или кубического (конкурентное связывание) уравнения. Каждое измерение проводилось в трех параллельных пробах, все точки использовались при построении кривых титрования.

Табл. 26 Прочность взаимодействия семи изоформ 14-3-3 человека с фосфопептидами, соответствующими С-концевым PDZ-связывающим мотивам 18Е6 и 16Е6, по данным поляризации флуоресценции. Данные для изоформ 14-3-3 приведены в порядке уменьшения сродства к фосфопептидам. Для наглядного представления профилей аффинности ниже приведена тепловая карта, построенная на основе тех же данных (в самом низу приведена шкала в мкМ).

K _D (μM)							
Е6 \ 14-3-3	14-3-3γ	14-3-3ζ	14-3-3η	14-3-3τ	14-3-3β	14-3-3ε	14-3-3σ
18Е6	11 ± 1	22 ± 1	24 ± 6	38 ± 6	42 ± 6	101 ± 20	139 ± 24
16Е6	37 ± 3	74 ± 19	80 ± 17	144 ± 28	159 ± 45	>300	>300

K _D (μM)							
Е6 \ 14-3-3	14-3-3γ	14-3-3ζ	14-3-3η	14-3-3τ	14-3-3β	14-3-3ε	14-3-3σ
18Е6							
16Е6							



Еще более удивительно было то, что один и тот же фосфопептид демонстрировал различное сродство к разным изоформам 14-3-3, с максимальной разницей в связывании с 14-3-3γ (самое сильное связывание) и 14-3-3σ (самое слабое связывание) для обоих фосфопептидов, составляющей ~12 раз. С учетом почти полной консервативности внутренней поверхности амфипатических бороздок у разных изоформ 14-3-3 (Рис. 6), такая значительная разница при связывании коротких фосфопептидов, которая сохраняется для двух разных фосфопептидов Е6, на данный момент, не может быть однозначна объяснена. Можно предполагать, что различия в аффинности связаны с различиями в динамике структуры изоформ 14-3-3, в частности, в их разной пластичности при переходах из открытого в закрытое состояние, как изображено на Рис. 37. Было показано, что С-концевой пептид 14-3-3ζ может выполнять автоингибирующую роль при связывании фосфопептидов, занимая амфипатические бороздки 14-3-3 [130, 223], однако этого не было показано для других изоформ 14-3-3. Нельзя исключить, что вариации в аминокислотном составе и длине С-концевых гибких пептидов 14-3-3 могут приводить к различиям в сродстве к лигандам. Данные, представленные на Рис. 73 и в Табл. 26, получены с использованием полноразмерных изоформ 14-3-3 человека, содержащих С-концевые пептиды. Однако отдельно проведенное исследование взаимодействия фосфопептида 16Е6 с изоформами, укороченными с С-конца, показало, что разница в сродстве разных изоформ 14-3-3 сохраняется (Рис. 74А-Г). При этом, мы обнаружили, что удаление С-концевого пептида в 14-3-3ε в 1,8 раза увеличивает сродство этой изоформы к фосфопептиду 16Е6 (ср. панели В и Д на Рис. 74), аналогично тому, как удаление С-концевого пептида устраняет автоингибирующий эффект в случае 14-3-3ζ [130, 223, 601]. В то же время удаление С-конца

в 14-3-3τ или 14-3-3β увеличило аффинность к фосфопептиду 16Е6 лишь в 1,07-1,08 раза, что согласуется с тем, что С-концы этих изоформ сходны между собой, в отличие от заметно более длинного и не похожего по аминокислотному составу С-конца 14-3-3ε (Рис. 6А).

Таким образом, мы подтвердили зависящее от фосфорилирования связывание С-концевых пептидов Е6 из двух самых распространенных подтипов HPV с высоким риском развития рака, 16 и 18, со всеми изоформами 14-3-3 человека, выявив при этом интересные закономерности в специфичности связывания. Интерактомный анализ позволил выявить существенные различия в сродстве фосфопептидов Е6 к семи изоформам 14-3-3 человека (Табл. 26). Примечательно, что пептиды киназы LRRK2 [157], а также пептиды белка CFTR [169] с совершенно другими последовательностями демонстрировали похожие тренды аффинности к семи изоформам 14-3-3 человека. Это указывает на наличие глобальной иерархии силы изоформ 14-3-3 при связывании любых фосфорилированных лигандов. Однако наблюдаемая разница в силе изоформ, судя по всему, не компенсируется разницей в уровнях их представленности в человеческом протеоме. Так, по данным базы PAXdb [602], наиболее представленной является 14-3-3ε (48-ой самый распространенный белок в человеческом протеоме, состоящем из 19949 белков), а самой наименее представленной – 14-3-3σ (820-ая по представленности из 19949 белков), обе «слабых» изоформы 14-3-3.

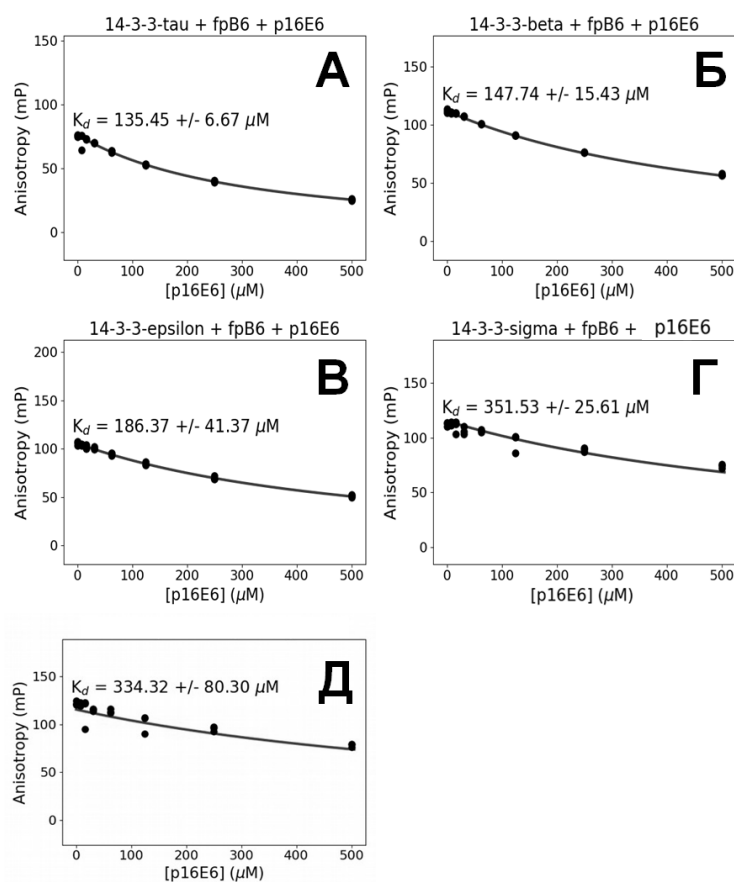


Рис. 74. Измерение аффинности фосфопептида 16Е6 к усеченным с С-конца изоформам 14-3-3τ (А), 14-3-3β (Б), 14-3-3ε (В) и 14-3-3σ (Г), по данным поляризации флуоресценции с конкурентным титрованием. Панель Д соответствует титрованию полноразмерного белка 14-3-3ε и приведена для сравнения с панелью В. Фосфопептид 16Е6 добавляли к эквимоллярной смеси соответствующей изоформы 14-3-3 и репортера fpB6 (фосфопептид В6, меченный флуоресцеином). Полученные кривые, соответствующие вытеснению связанного репортера при добавлении немеченного фосфопептида аппроксимировали с помощью кубического уравнения. Каждое измерение проводилось в трех параллельных пробах, все точки использовались при построении кривых титрования.

Кристаллическая структура химеры 14-3-3ζ с фосфопептидом 18Е6. Чтобы получить структурное представление о взаимодействиях 14-3-3ζ с 18Е6 РВМ, мы сконструировали белково-пептидную химеру для ко-экспрессии с РКА в клетках *E.coli* (Рис. 75А) и произвели ее очистку с использованием отщепляемого гис-тага с помощью вычитающей металлоаффинной хроматографии и гель-фильтрации (Рис. 75Б и В). Как и для химеры 14-3-3ζ с фосфопептидом ВAD, последовательность 14-3-3ζ была модифицирована для исключения фосфорилирования Ser58 и для облегчения кристаллизации, и была соединена с фосфопептидом 18Е6 RRREpTQV-COOH через линкер GGGG (Рис. 75А). Такой подход был оправдан из-за разупорядоченной структуры Е6 РВМ [603, 604].

Химера 14-3-3ζ-18Е6 была стехиометрически фосфорилирована при ко-экспрессии с РКА, что увеличивало электрофоретическую подвижность при электрофорезе в нативных условиях (Рис. 75Г), и была закристаллизована. В независимой части структуры, определенной нами с помощью РСА с разрешением 1,9 Å (код РDB 6ZFD), располагался один димер 14-3-3 с присоединенными фосфопептидами 18Е6 (Рис. 76). Фосфопептиды димера были связаны *in-trans* с АБ 14-3-3ζ соседних димеров, приводя к обмену фосфопептидами (Рис. 76Б). Такое расположение, наблюдавшееся ранее для химер 14-3-3σ с другими фосфопептидами (см. Рис. 62, Рис. 64, Рис. 65), обеспечило детальную структурную информацию о взаимодействии 14-3-3ζ с фосфопептидом 18Е6, который представляет собой наименее охарактеризованный 14-3-3-связывающий мотив III (Рис. 77А-В). Благодаря четкой карте электронной плотности можно было проследить конформацию всех остатков фосфопептида 18Е6 вплоть до С-концевой карбоксильной группы, наличие которой уникально для 14-3-3-связывающего мотива III. Фосфопептид стабилизируется в АБ 14-3-3ζ благодаря множественным полярным контактам: Н-связям фосфо-Thr156 с консервативными остатками Arg56, Arg129, Lys49 и Tyr128 в АБ 14-3-3ζ, взаимодействиям основной цепи фосфопептида с остатками Asn224 и Asn173 14-3-3, примечательному полярному контакту карбоксильной группы фосфопептида и боковыми цепями остатка Lys120 и одной из двух альтернативных конформаций остатка Ser45 14-3-3ζ (Рис. 77В). Ориентация карбоксильной группы остатка Val158 дополнительно стабилизировалась посредством водородной связи с боковой цепью предшествующего остатка Gln157, в то время как боковая цепь Val158 была обращена к остатку Val46 14-3-3, образуя гидрофобный контакт (Рис. 77В). Другой интересный гидрофобный контакт наблюдался между боковой цепью Val176 14-3-3ζ и метильной группой фосфорилированного остатка Thr156. Такой контакт, предположительно, указывает на более стабильное связывание фосфотреонина, чем фосфосерина.

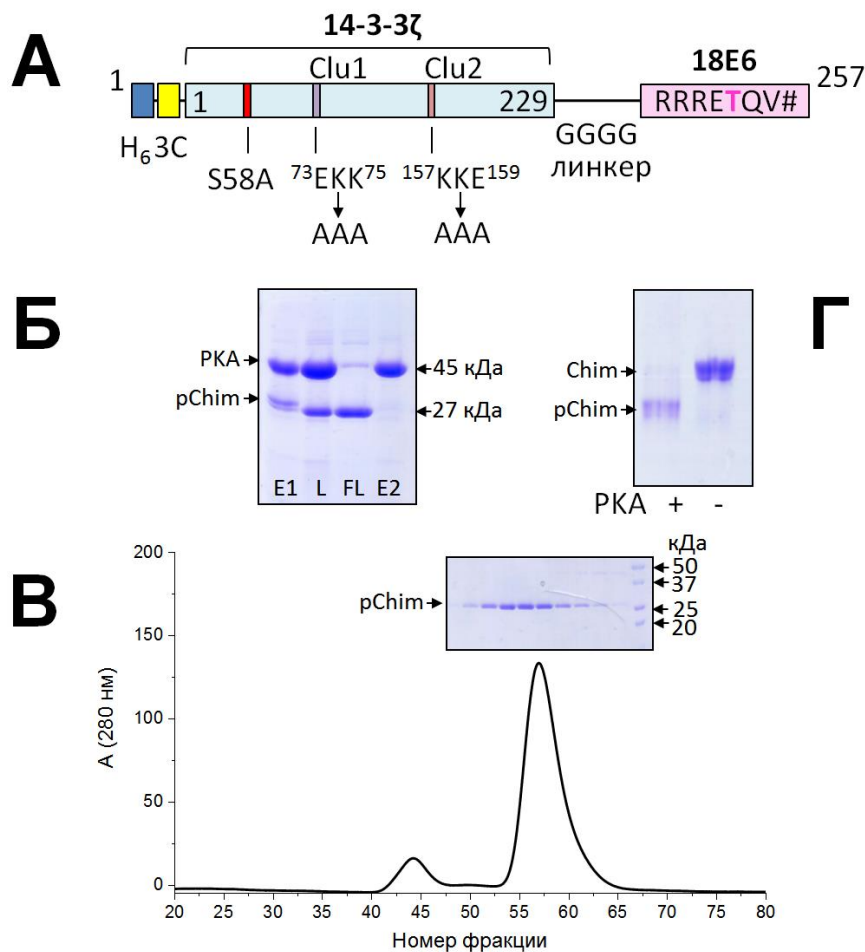


Рис. 75. Дизайн и очистка химеры 14-3-3 ζ с фосфопептидом 18Е6 (рСН7). А. Схематическое изображение первичной структуры химеры. Указаны His-таг, сайт расщепления 3С протеазой, ядро 14-3-3 ζ , модифицированное для предотвращения фосфорилирования Ser58 и ускорения кристаллизации с помощью замен, уменьшающих поверхностную энтропию (кластеры с наибольшей оценкой 1 и 2 (clu1 и clu2, соответственно)), линкер GGGG и С-концевой фосфорилируемый пептид 18Е6 (положение фосфорилируемого треонина выделено). С-концевая карбоксильная группа обозначена # и соответствует С-концу белка 18Е6. Б. Очистка химеры после ко-экспрессии с РКА с помощью ИМАС, по результатам ДСН-электрофореза: E1 – фракция белков, связавшихся с колонкой HisTrap HP (GE Healthcare), L – фракция E1 после 3С протеолиза, наносимая на колонку HisTrap HP повторно, FL – фракция белков проскока при повторном нанесении, содержащая фосфорилированную химеру, E2 – His-таг содержащие белки, повторно связавшиеся с колонкой. Положения РКА и химеры, а также их кажущиеся Mw показаны стрелками. Сдвиг полосы химеры при обработке 3С связан с удалением His-тага. В. Профиль ГФ для химеры на колонке Superdex 75 26/60 (Pharmacia) с анализом содержания белка в главном пике с помощью ДСН-электрофореза. Стрелки указывают положения маркеров, химеры и Mw (показаны в кДа). Г. Нативный гель-электрофорез очищенной химеры, экспрессированной в присутствии (+) или в отсутствие РКА (-). Более высокая электрофоретическая подвижность фосфорилированной химеры обусловлена дополнительным отрицательным зарядом фосфатной группы.

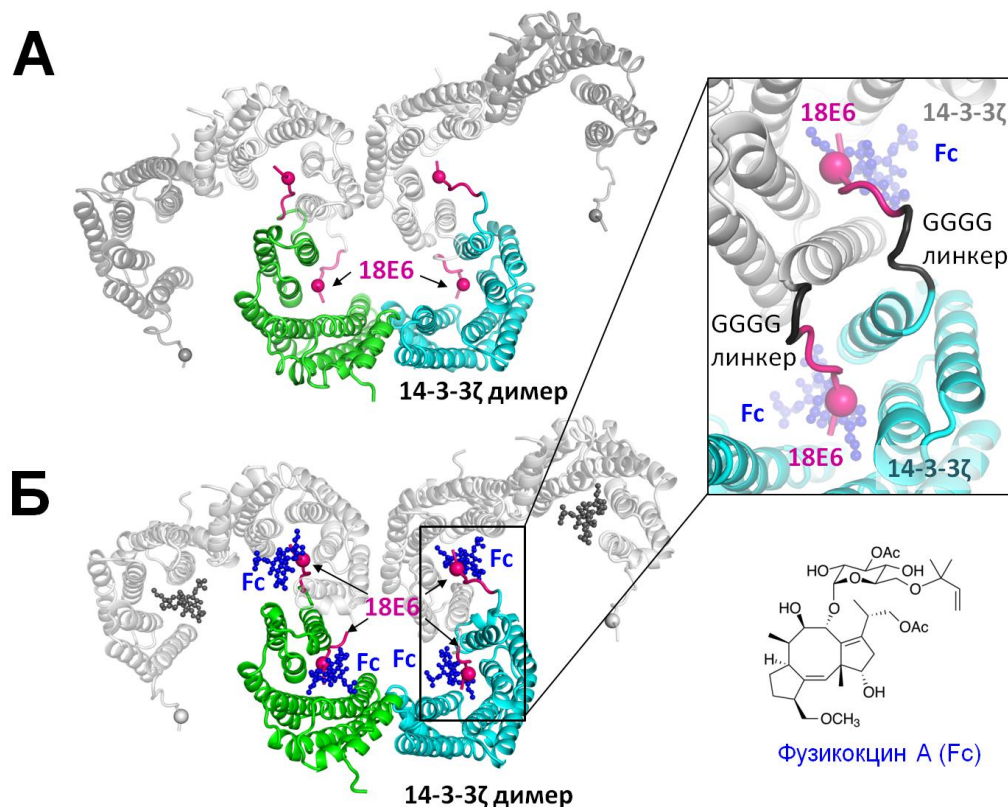


Рис. 76. Кристаллическая укладка химеры rCH7 в отсутствие (А) или в присутствии фузикоцина, Fc (Б). Один димер 14-3-3ζ в независимой части окрашен, его кристаллографически симметричные димеры – светло-серые. Фосфопептиды 18Е6 (пурпурные) отмечены стрелками, остатки фосфотреонина показаны сферами. Обмен фосфопептидами, стабилизирующий надмолекулярную сборку, показан в увеличенном виде только для структуры с Fc. Химическая формула Fc показана в правом нижнем углу.

Отдельно нами была получена ко-кристаллическая структура 14-3-3σ с синтетическим фосфопептидом E6 SSRTREpTQL-COOH из наиболее распространенного подтипа, HPV16 («16E6»). Несмотря на более низкое разрешение (2,8 Å), вся конформация пептида 16E6 также четко прослеживалась в АБ 14-3-3σ. Принципиально важно, что конформации пептидов E6 от двух разных подтипов HPV, закристаллизованные с разными изоформами 14-3-3 с помощью двух альтернативных подходов, были практически идентичными (Cα r.m.s.d. 0,17 Å, Рис. 77Г). В обоих случаях карбоксильная группа дает полярный контакт с боковой цепью Lys120 14-3-3, а гидрофобная боковая цепь последнего пептидного остатка (Val158 в случае 18E6 и Leu151 в случае 16E6) обращена к боковой цепи Val46 в 14-3-3, указывая на корректность установленной нами конформации E6 РВМ в канавках 14-3-3 (Рис. 77Г). Сходство конформаций синтетического фосфопептида и пептидного фрагмента, присоединенного к 14-3-3 в составе химерной конструкции, в очередной раз доказывало состоятельность разработанного нами «химерного» подхода к изучению комплексов 14-3-3 с фосфопептидами.

Сравнение структур комплексов 14-3-3 с фосфопептидами 16Е6 и 18Е6, приведенное на Рис. 77Г, позволило нам объяснить более высокую аффинность фосфопептида 18Е6. Только в случае 18Е6 фосфопептида наблюдаются стабилизирующий контакт остатка Arg в положении -6 с карбонильным кислородом остатка Asp223 14-3-3 и опосредованный молекулой воды контакт с боковой группой остатка Asn224 14-3-3. В пептиде 16Е6 вместо Arg-6 имеется остаток треонина, а остаток Arg-7, являющийся детерминантой специфичности РКВ/Акт-подобных базофильных киназ (Рис. 72), дает уникальный солевой мостик *in-cis* с боковой цепью остатка Glu в положении -3 (Рис. 77Г).

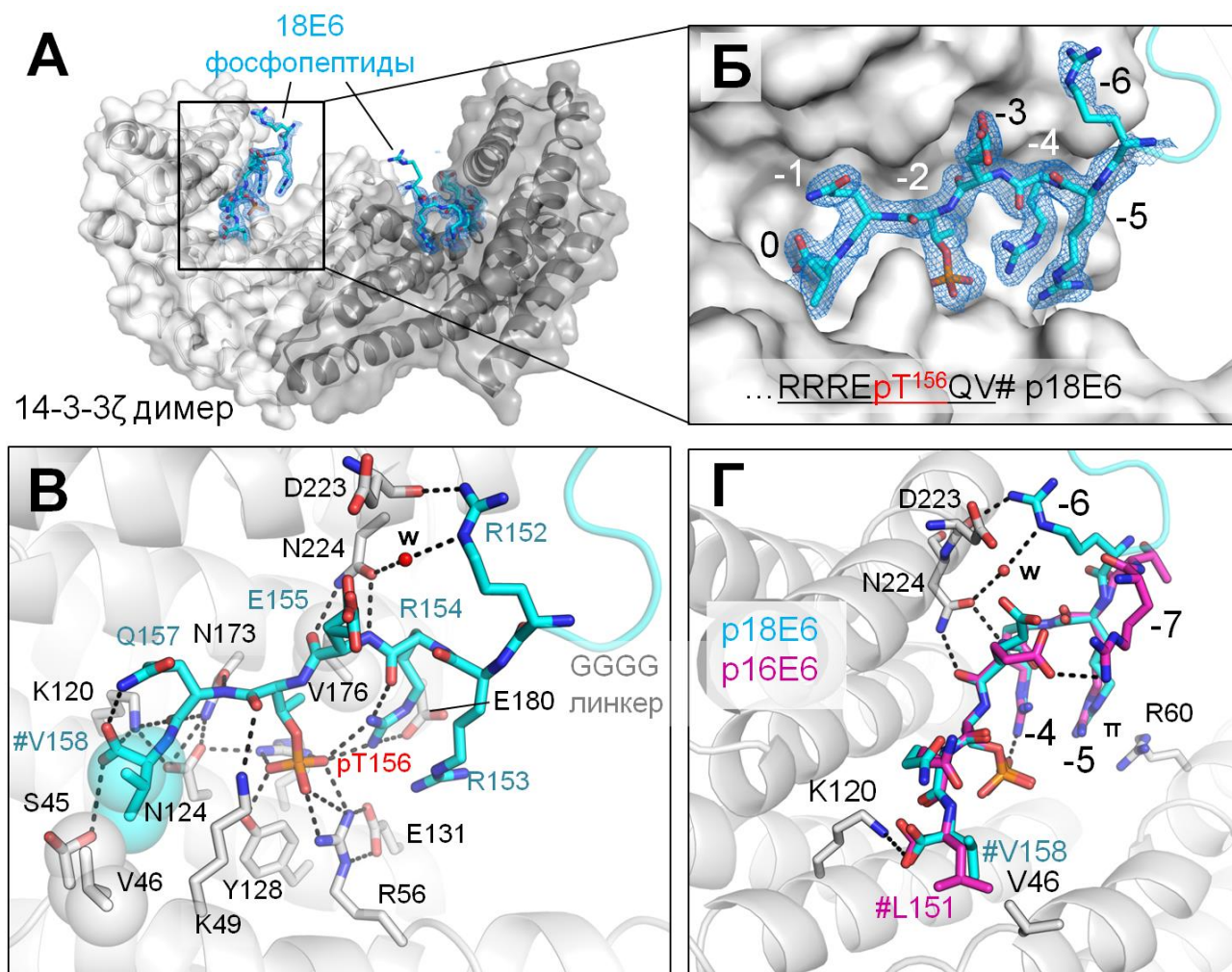


Рис. 77. Кристаллографический интерфейс между 14-3-3 ζ и фосфопептидом 18Е6 (код PDB 6ZFD, разрешение 1,9 Å). А. Общий вид димера 14-3-3 ζ (субъединицы показаны оттенками серого) с двумя связанными фосфопептидами 18Е6 (голубые). Б. Конформация фосфопептида 18Е6 в амфипатической бороздке 14-3-3 ζ с 2Fo-Fc картой электронной плотности (контур 1 σ). В. Полярные контакты (пунктирные линии) и гидрофобные взаимодействия (полупрозрачные сферы), стабилизирующие конформацию связанного пептида 18Е6. w – молекула воды. Г. Наложение двух 14-3-3-связанных фосфопептидов из 16Е6 (код PDB 6TWZ, разрешение 2,8 Å) и 18Е6 (код PDB 6ZFD, разрешение 1,9 Å), показывающее сходство конформации. # обозначает С-конец. w – молекула воды.

Поскольку последовательность пептида 18Е6 (RRREpTQV) идентична последовательности пептида 97Е6 и очень похожа в центральной части на последовательности пептида 39Е6 (TRREpTQV) и 85Е6 (SRREpTQV), мы предполагаем, что полученная с помощью химеры структура комплекса 14-3-3 ζ -18Е6 (Рис. 77) также является репрезентативной, по крайней мере, для нескольких взаимодействий 14-3-3 ζ /Е6. Аналогично, 14-3-3-связанная конформация других Е6 РВМ подгруппы 1, 58Е6 (RRRQpTQV) и 35Е6 (TRREpTEV), вряд ли будет слишком сильно отличаться из-за незначительных различий в их первичных структурах (здесь и выше сходные центральные части подчеркнуты).

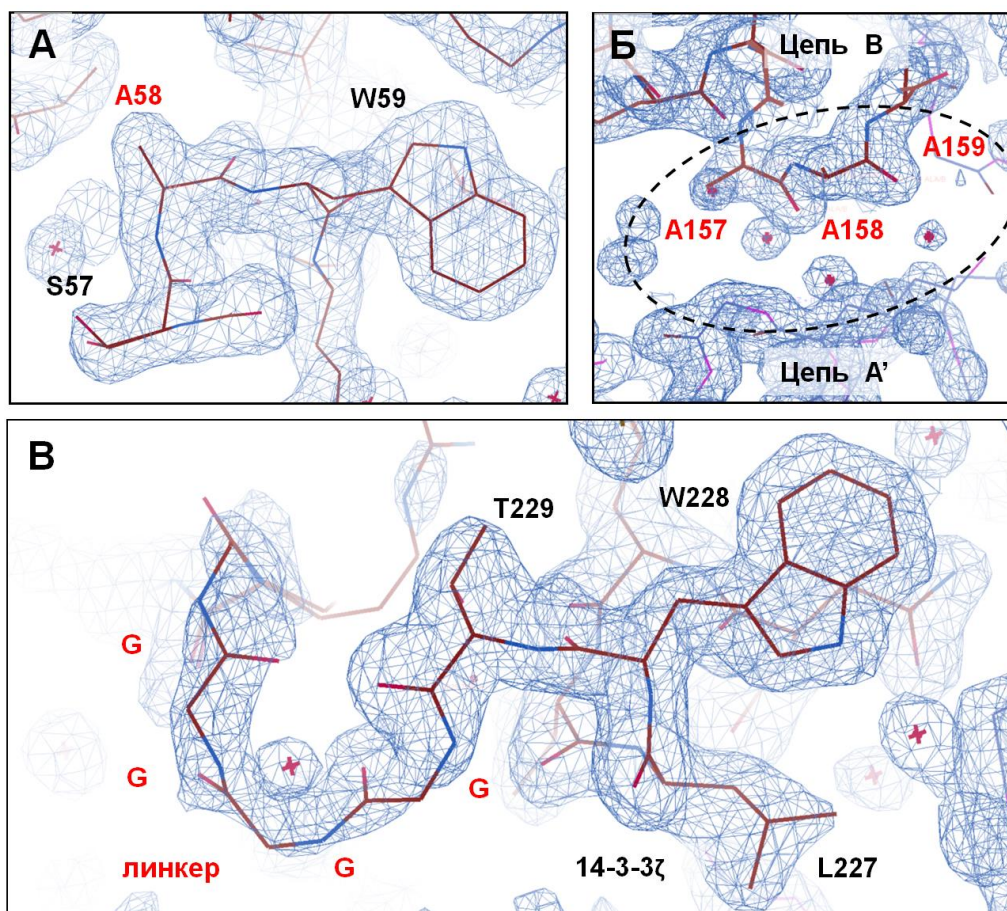


Рис. 78. Подтверждение целесообразности введенных модификаций в химерную конструкцию на основе кристаллографического анализа структуры 14-3-3 ζ -18Е6 химеры. А. Фрагмент структуры химеры, показывающий положение и боковую цепь остатка Ala58, введенного вместо Ser58 для блокирования фосфорилирования. Б. Фрагмент структуры химеры, показывающий расположение замен остатков 157-159 на аланины в области образования кристаллического контакта между полипептидными цепями (обведен пунктирным овалом). В силу размера своих боковых цепей и заряда исходные остатки ¹⁵⁷ККЕ¹⁵⁹ могли помешать образовывать такой кристаллический контакт. В. Фрагмент структуры химеры, показывающий расположение линкера GGGG, соединяющего консервативные остатки ...L²²⁷W²²⁸T²²⁹ 14-3-3 ζ и фосфопептид. Все фрагменты приведены с картой электронной плотности 2Fo-Fc с контуром 1 σ . Звездочки соответствуют атомам кислорода молекул воды.

Полученная кристаллическая структура химеры также иллюстрирует целесообразность введенных модификаций в последовательность 14-3-3 ζ : замены Ser58Ala, блокирующей фосфорилирование под действием РКА в интерфейсе димера 14-3-3 ζ (Рис. 78А), а также замен, снижающих поверхностную энтропию и повышающих кристаллизуемость (один из кластеров (Рис. 69), где была произведена замена, привел к образованию кристаллического контакта – см. Рис. 78Б). Все остатки линкера GGGG, устойчивого к фосфорилированию, также оказались видны в картах электронной плотности (Рис. 78В). Его наличие в случае химеры 14-3-3 ζ -18Е6 никак не искажало ход основной цепи связанного пептида 18Е6, поэтому можно заключить, что такие длина и аминокислотный состав линкера, на данный момент, представляются самыми оптимальными для химерных конструкций на основе белков 14-3-3.

Фузикоцин дестабилизирует взаимодействие 14-3-3 с фосфопептидами Е6. Связывание фосфопептидов 18Е6 и 16Е6 с амфипатическими бороздками 14-3-3 оставляет достаточный карман для взаимодействия с малыми молекулами. Чтобы это проверить, мы использовали хорошо изученный стабилизатор белок-белковых взаимодействий с участием 14-3-3 – грибной токсин фузикоцин (Fc) [70, 109, 169, 497, 605-607]. Взаимодействие 14-3-3 (10 μ М) с обоими фосфопептидами, 16Е6 и 18Е6, исследовали в присутствии 100 μ М Fc с помощью конкурентного вытеснения флуоресцентно-меченного репортера при измерении поляризации его флуоресценции, аналогично тому, как описано выше (Рис. 73 и Рис. 74). Такая концентрация Fc была продиктована его ожидаемым сродством к 14-3-3 в отсутствие фосфопептидов ($K_D \sim 50$ μ М [146]). Полученные при аппроксимации кубическим уравнением значения констант диссоциации комплексов 14-3-3-Е6 в присутствии Fc (Рис. 79) сравнивали с аналогичными значениями, полученными в отсутствие Fc (Рис. 73).

Мы обнаружили 1,5-2-кратное увеличение кажущейся константы диссоциации комплексов 14-3-3 с обоими фосфопептидами для двух изоформ 14-3-3 – γ и ζ (Табл. 27). Такое неожиданное уменьшение сродства фосфопептида к 14-3-3 в присутствии Fc означало его дестабилизирующий эффект.

Табл. 27. Эффект фузикоцина (Fc) на взаимодействие двух изоформ 14-3-3 с фосфопептидами Е6 двух подтипов, по данным поляризации флуоресценции.

Е6	K_D (μ М)			
	14-3-3 ζ	14-3-3 ζ + Fc	14-3-3 γ	14-3-3 γ + Fc
HPV18E6	22 \pm 1	37 \pm 5	11 \pm 0.6	19 \pm 2
HPV16E6	74 \pm 19	161 \pm 23	37 \pm 3	92 \pm 13

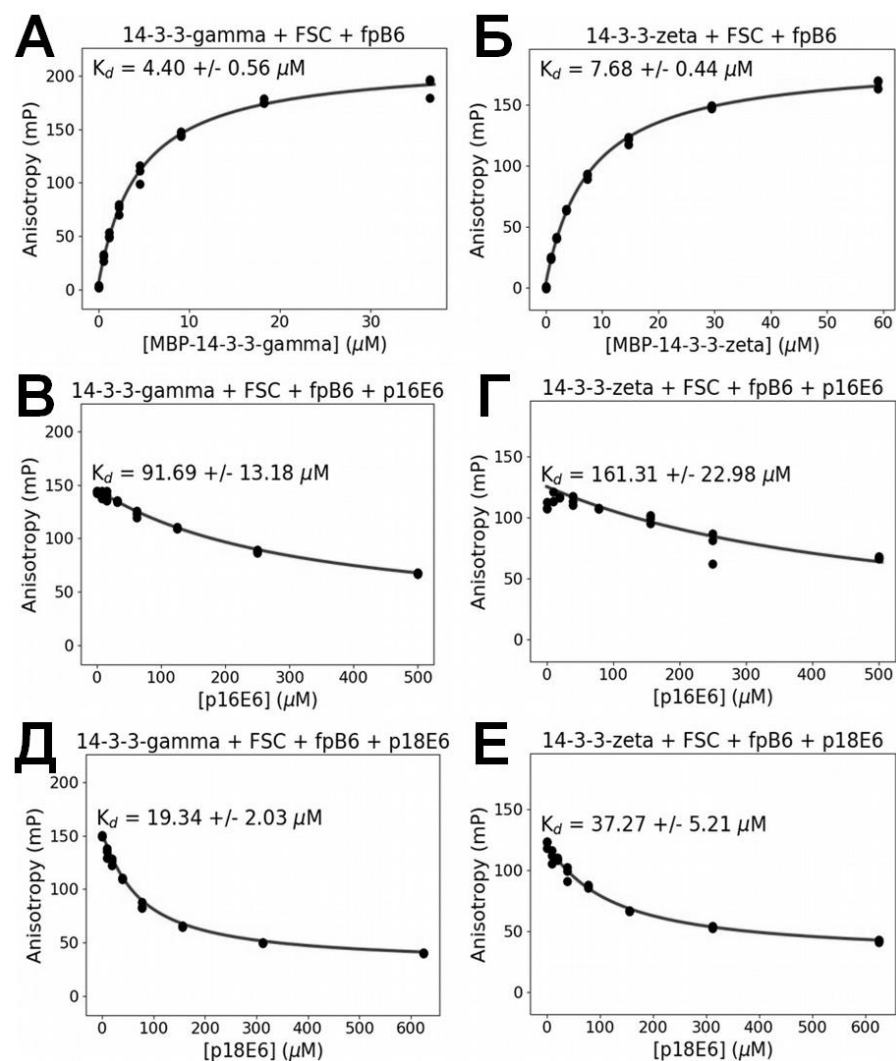


Рис. 79. Эффект Fc на взаимодействие 14-3-3 γ (А, В, Д) или 14-3-3 ζ (Б, Г, Е) с фосфопептидом 16E6 (В, Г) или 18E6 (Д, Е), по данным поляризации флуоресценции в режиме конкурентного титрования. Панели А и Б показывают прямое связывание репортерного фосфопептида В6, меченного флуоресцеином (fpB6), в присутствии фузикокина (FSC) с 14-3-3 γ и 14-3-3 ζ , соответственно. В остальных случаях эквимольную смесь 14-3-3 с репортерным фосфопептидом (по 10 μM каждого) в присутствии 100 μM FSC титровали увеличивающимися концентрациями фосфопептидов 16E6 или 18E6, регистрируя уменьшение поляризации из-за вытеснения репортера. Каждое измерение проводилось в трех параллельных пробах, все точки использовались при построении кривых титрования.

Структурная основа дестабилизирующего действия фузикокина. Фузикокин работает как стабилизатор комплексов с участием с 14-3-3, когда его связывание в амфипатической бороздке 14-3-3 совместимо с конформацией боковых цепей остатков фосфопептида в положениях +1...+3 относительно фосфорилированного остатка. Известно, что связывание Fc стабилизирует взаимодействие 14-3-3 с несколькими фосфопептидами мотива I (например, пептидом Gab2, код PDB 5EXA [497] и пептидом CFTR, код PDB 5D3F

[169]) и множеством пептидов, соответствующих короткому мотиву III, pS/pTX-COON, которые были систематически проанализированы в нескольких исследованиях [605, 607, 608]. В то же время очень мало известно о влиянии Fc на связывание с 14-3-3 более длинных пептидов мотива III, имеющих более одного остатка к С-концу после фосфорилируемого, таких как в белках E6.

Для того чтобы объяснить необычное дестабилизирующее действие фузикокина (Fc) на связывание 14-3-3 с фосфопептидами белков E6, мы получили кристаллическую структуру комплекса 14-3-3 ζ -18E6 химеры со связанным Fc путем вымачивания кристаллов химеры в растворе Fc. Структура тройного комплекса 14-3-3 ζ -18E6-Fc (Рис. 80А,Б), полученная с разрешением 1,85 Å (код PDB 6ZFG), позволила идентифицировать связывание Fc в хорошо описанном для него кармане в АБ 14-3-3 [109, 146, 608, 609], бок-о-бок с фосфопептидом 18E6 (Рис. 80В,Г). Упаковка кристаллической решетки при связывании Fc несколько изменялась по сравнению с таковой у свободной химеры 14-3-3 ζ -18E6, однако принципиальный обмен фосфопептидами между соседними димерами 14-3-3 сохранялся (Рис. 76). Стоит отметить, что сходная структура была получена при ко-кристаллизации химеры и Fc, однако мы смогли собрать только данные более низкого разрешения (около 3 Å), поэтому далее они не были использованы для уточнения структуры. Новая структура подтвердила пользу от введенных модификаций в последовательность 14-3-3 ζ при дизайне химерной конструкции, поскольку оба кластера остатков с повышенной энтропией при замене на аланины привели к образованию кристаллических контактов (Рис. 81).

В тройном комплексе Fc образует полярные контакты с остатками Asn42 и Asp213 и гидрофобные взаимодействия с остатками Phe117, Ile166, Ile217 и Leu216, а также Н-связь между своим 3-метокси атомом кислорода и боковой цепью остатка Lys120 14-3-3 ζ (Рис. 80Б). Последний контакт нарушает взаимодействие Lys120 с карбоксильной группой фосфопептида 18E6, образованной в отсутствие Fc (Рис. 77В), приводя к смещению карбоксильной группы в другое положение, из которого становится возможным установление нового контакта с 12-гидроксигруппой Fc (Рис. 80Б). Lys49 14-3-3 ζ меняет свое положение и связь с карбонилем основной цепи остатка pThr156 (Рис. 77В), на новое, в котором он связывается с 12-гидроксигруппой Fc (Рис. 80Б). В результате перестройки, вызванной связыванием Fc, боковая цепь С-концевого остатка Val158 фосфопептида 18E6 сдвигается на 3,5 Å в сторону фосфатной группы Thr156, разрывая гидрофобный контакт с Val46 14-3-3 ζ , что сопровождается значительной делокализацией электронной плотности (Рис. 80Б). В результате, хотя большая часть конформации пептида осталась неизменной, В-

факторы последнего остатка фосфопептида 18E6 в уточненной структуре комплекса с Fc значительно увеличились (Рис. 80Г). Следовательно, связывание Fc вызывает явное напряжение конформации С-конца фосфопептида 18E6. Связывание Fc также приводит к закрытию последней α -спирали 14-3-3 ζ на $\sim 4 \text{ \AA}$ (Рис. 80Г), что, по-видимому, вызывает наблюдаемые небольшие изменения в упаковке молекул в кристаллической решетке (Рис. 76). Высокое разрешение наших структур выявляет существенную перестройку цепочки молекул воды, связанных в отсутствие Fc и в его присутствии (Рис. 82).

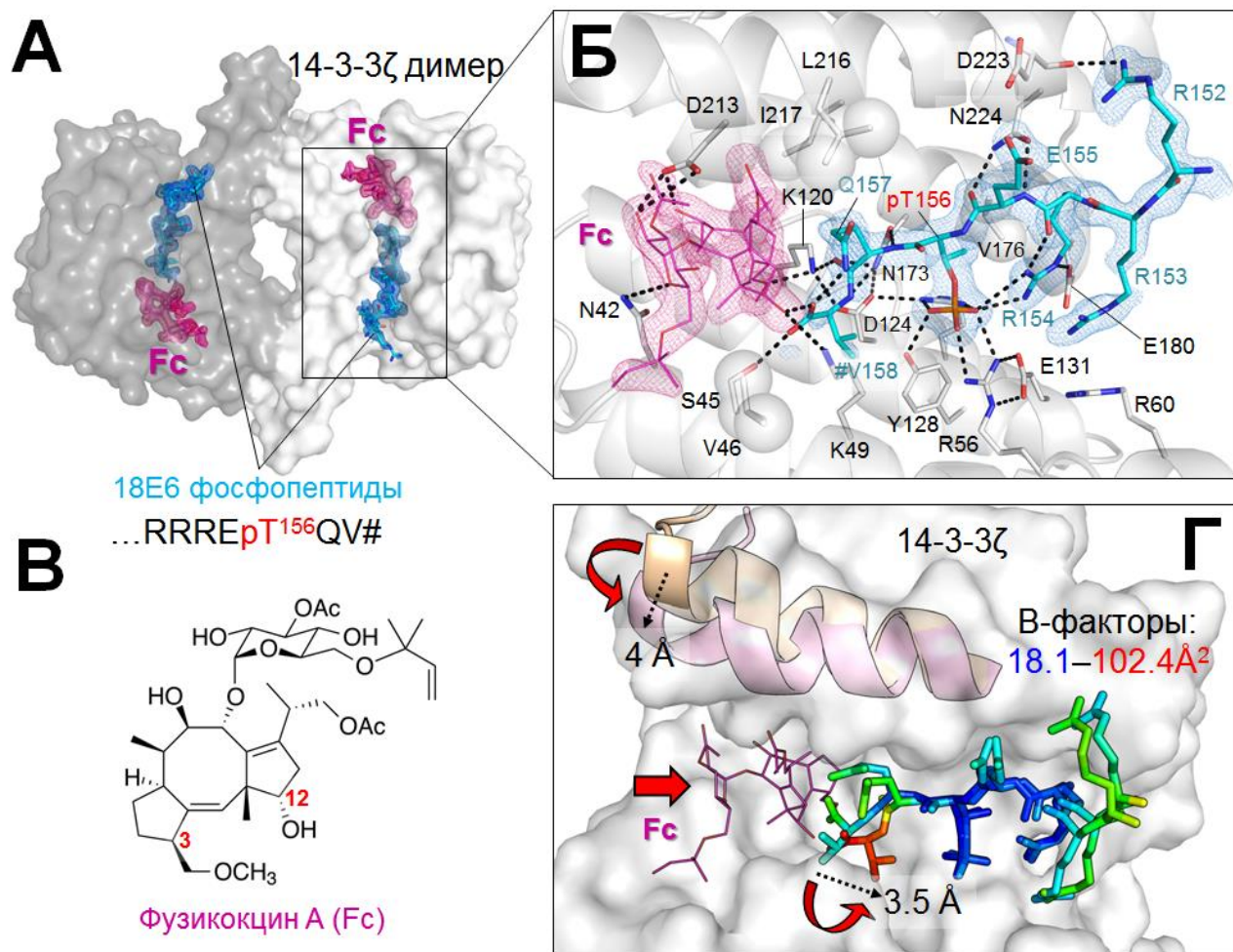


Рис. 80. Структурная основа эффекта Fc на взаимодействие 14-3-3 ζ с фосфопептидом 18E6 (код PDB 6ZFG, разрешение 1,85 Å). А. Общий вид тройного комплекса между 14-3-3 ζ (субъединицы показаны двумя оттенками серого), фосфопептида 18E6 (голубой) и Fc (розовый). Б. Полярные контакты (пунктирные линии) и гидрофобные взаимодействия (полупрозрачные сферы), определяющие положение фосфопептида 18E6 (голубой) и Fc (розовый) в АБ 14-3-3 ζ (полупрозрачные серые спирали). 2Fo-Fc карты электронной плотности (1σ) показаны для пептида и Fc. Значок # символизирует С-конец. Линкер GGGG не показан. В. Химическая формула Fc. Г. Конформационные изменения при связывании Fc показаны красными стрелками (сдвиг С-концевой α -спирали 14-3-3, вращение и перемещение С-концевых остатков в пептиде 18E6, увеличение их подвижности (В-факторов, показаны градиентом от синего до красного). Амплитуды изменений показаны пунктирными стрелками.

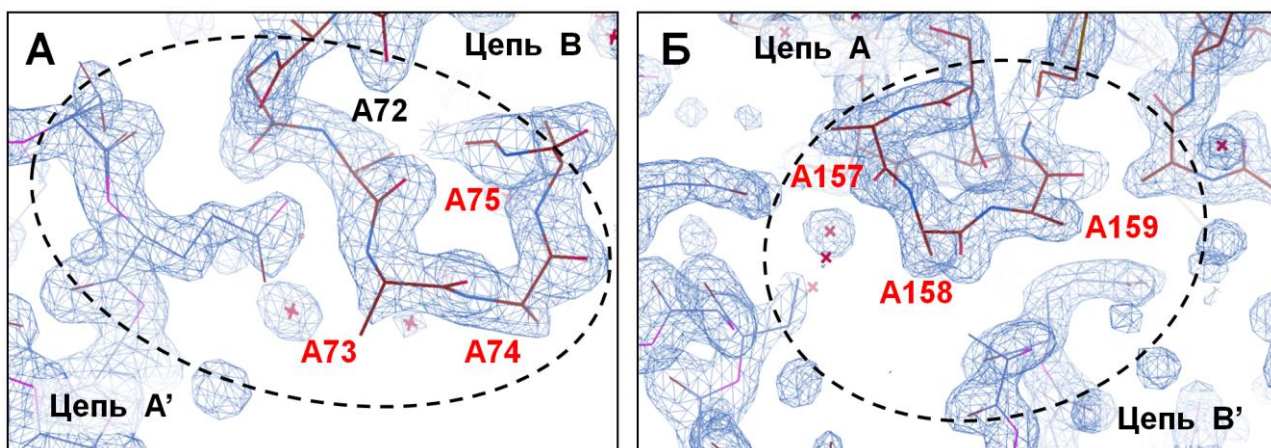


Рис. 81. Подтверждение целесообразности введенных модификаций в химерную конструкцию на основе кристаллографического анализа структуры тройного комплекса 14-3-3ζ-18E6 химеры с Fc. А. Фрагмент структуры, показывающий расположение замен остатков 73-75 на аланины в области образования кристаллического контакта между полипептидными цепями (обведен пунктирным овалом). Б. Фрагмент структуры, показывающий расположение замен остатков 157-159 на аланины в области образования кристаллического контакта между полипептидными цепями (обведен пунктирным овалом). В силу размера своих боковых цепей и заряда исходные остатки $^{73}\text{EKK}^{75}$ и $^{157}\text{ККЕ}^{159}$ могли помешать образовывать такие кристаллические контакты. Фрагменты приведены с картой электронной плотности $2\text{Fo}-\text{Fc}$ с контуром 1σ . Звездочки соответствуют атомам кислорода молекул воды.

Несмотря на дестабилизирующее действие Fc, карта электронной плотности в нашей структуре тройного комплекса с Fc позволила проследить все остатки в области взаимодействия, лишь с небольшой делокализацией электронной плотности в районе C-концевого остатка фосфопептида. В работах других авторов Fc вызывал гораздо более сильную делокализацию электронной плотности 14-3-3-связывающего пептида. Например, в структуре PDB 5MXO связывание Fc приводило к тому, что из 12 остатков пептида упорядоченная электронная плотность наблюдалась только для трех [610]. Еще более выраженная делокализация электронной плотности при связывании Fc наблюдалась в структуре PDB 6QDU, где оставался виден лишь один фосфорилированный остаток [561]. Эти наблюдения косвенно указывают на недостаточную заселенность и упорядоченность конформации синтетического пептида в структурах тройных комплексов с модуляторами, полученных с помощью традиционных подходов, чего мы не наблюдаем при использовании химерных конструкций на основе 14-3-3.

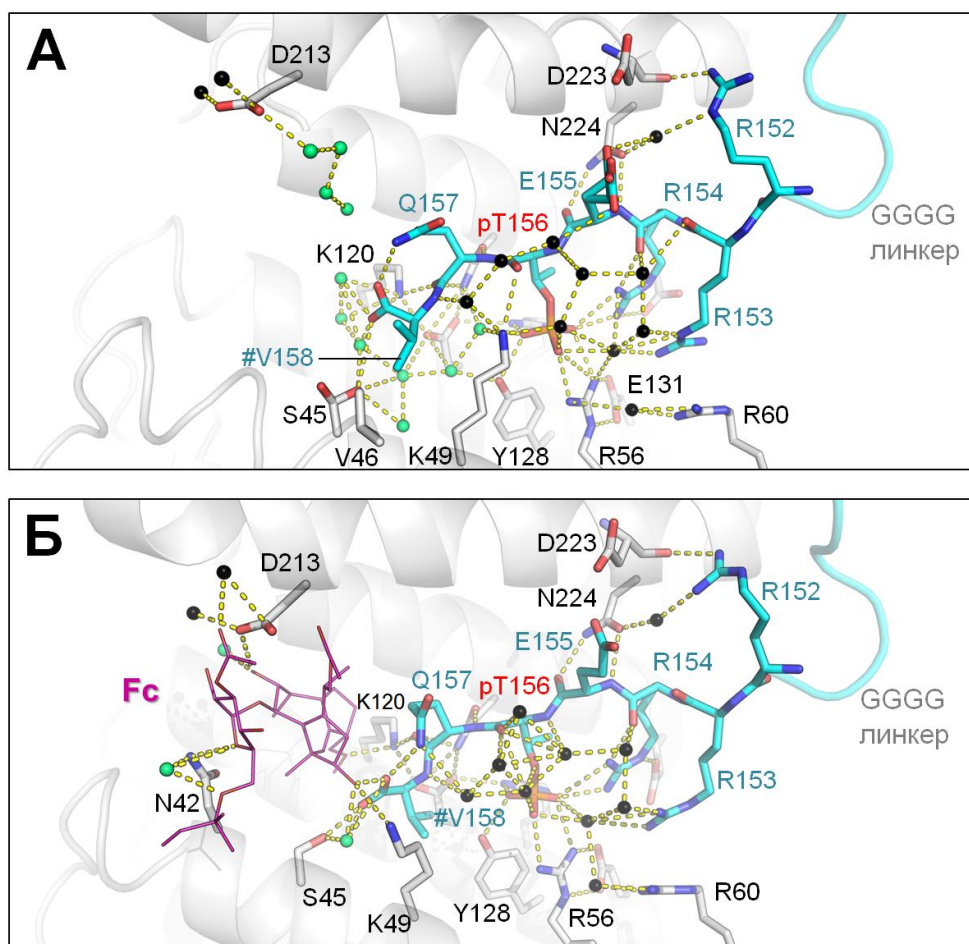


Рис. 82. Сравнение опосредованных водой полярных контактов, образованных в интерфейсе 14-3-3 ζ /18E6 в отсутствие (А) или в присутствии фузикоцина (Fc) (Б). Основные остатки, участвующие во взаимодействиях, показаны палочками с цветовой кодировкой: светло-серый (14-3-3), голубой (18E6), оранжевый (фосфогруппа Thr156). Fc показан тонкими пурпурными палочками, молекулы воды, на расположение которых влияет связывание Fc, показаны светло-зелеными шариками, одинаковые молекулы воды в двух структурах показаны черными шариками. С-концевой остаток 18E6 (V158) обозначен #. При связывании Fc происходит значительное перераспределение молекул воды.

Таким образом, мы показали, что химеры на основе 14-3-3 применимы к структурным исследованиям комплексов с фосфопептидами, а также тройных комплексов с соединениями-модуляторами. При фосфорилировании С-концевые пептиды Е6 РВМ идеально соответствуют 14-3-3-связывающему мотиву III (pS/pTXX-COOH) с двумя С-концевыми остатками после фосфорилированного треонина (Рис. 72). Этот подтип мотивов III недостаточно представлен в PDB, в отличие от фосфопептидов мотива III с одним остатком после фосфорилируемого (Табл. 28). Единственной опубликованной ранее структурой с пептидом pS/pTXX-COOH является структура комплекса 14-3-3 γ с фосфопептидом белка NS1 вируса гриппа (код PDB 4O46 [268]), а также наша структура

химеры 14-3-3 σ с фосфопептидом AANAT (Рис. 64), обе довольно низкого разрешения 2,9-3,0 Å (Табл. 28). Белок NS1 вируса гриппа и другие примеры, которые включают белок W хенипавируса, связывающийся с 14-3-3 σ за счет С-концевого мотива III RRMpSN-COOH [263], аденовирусный белок Рер68, который связывается с 14-3-3 за счет С-концевого мотива III RGHpSL-COOH [264] и белок X вируса гепатита В, связывающийся с 14-3-3 ζ посредством расположенного внутри последовательности пептида RPLpSGP [265], вместе показывают, что вирусные белки часто используют свои структурные элементы для имитации свойств 14-3-3-связывающих пептидов клетки-хозяина, чтобы «взломать» клеточные функции, зависящие от 14-3-3. Одним из возможных механизмов является 14-3-3-опосредованная стабилизация вирусных белков с целью избежать дефосфорилирования и деградации. Это может продлить время их жизни, увеличивая шансы на репликацию и дальнейшее инфицирование [261, 265].

Снижение аффинности связывания пептида мотива III с 14-3-3 под действием Fc является крайне редким. Такая ситуация наблюдается, например, в случае пептида альфа-цепи рецептора интерлейкина 9 (IL-R9 α), RSWpTF-COOH [605], однако структурная информация по его взаимодействию с 14-3-3 недоступна. Совсем недавно было показано ~3-кратное дестабилизирующее действие синтетического производного Fc на взаимодействие 14-3-3 с фосфопептидом KLRSpTSCANL мотива I белка RapGef2 [561]. В обоих этих случаях ожидается стерическое затруднение при одновременном связывании фосфопептида и Fc в амфипатической бороздке 14-3-3. Кроме этого, известно, что связывание с 14-3-3 самого короткого пептида мотива III RRQpT-COOH, принадлежащего ингибитору циклин-зависимой киназы (p27Kip1) и вовсе не содержащего остатков после фосфорилируемого, не зависит от Fc, скорее всего, из-за отсутствия прямых контактов между Fc и фосфопептидом, которые связываются в амфипатической бороздке 14-3-3 независимо друг от друга [605].

Таким образом, дополняя широкий спектр данных о стабилизирующем действии Fc, наши данные предоставляют собой редкое структурное доказательство того, что Fc может быть и негативным регулятором взаимодействий 14-3-3 с пептидами мотива III. После соответствующей модификации и оптимизации Fc может в будущем позволить селективную модуляцию взаимодействий вирусного белка и 14-3-3 в целях борьбы с вирусными инфекциями.

Табл. 28. Структуры комплексов 14-3-3 с фосфопептидами мотива III, доступные в PDB. Fc – фузикоцин, cotA – котиленин А, «модиф.» означает, что последовательность или длина пептида отличаются от нативных. Подчеркнутым жирным шрифтом выделены пептиды, соответствующие консенсусу pS/pTXX-COOH.

Код PDB	Мотив III типа	(pS/pT)Xn-COOH, n=	Белок-партнер 14-3-3	Комментарий	Разрешение
1O9D	QSYpTV-COOH	1	PMA2	1433+пептид	2.30 Å
1O9F	QSYpTV-COOH	1	PMA2	1433+пептид+Fc	2.70 Å
3E6Y	QSYpTV-COOH	1	PMA2	1433+пептид+cotA	2.50 Å
5NWI	YFSpSN-COOH	1	KAT1	1433+пептид	2.35 Å
5NWJ	YFSpSN-COOH	1	KAT1	1433+пептид	2.07 Å
5NWK	YFSpSN-COOH	1	KAT1	1433+пептид+Fc	3.30 Å
3IQU	QRSTpST-COOH	1	Raf1 (модиф.)	1433+пептид	1.05 Å
3IQV	QRSTpST-COOH	1	Raf1 (модиф.)	1433+пептид+Fc	1.20 Å
3P1N	KRRKpSV-COOH	1	TASK-3	1433+пептид	1.40 Å
3P1O	KRRKpSV-COOH	1	TASK-3	1433+пептид+Fc	1.90 Å
3P1P	KRRKpSV-COOH	1	TASK-3	1433 мутант+пептид	1.95 Å
3P1Q	KRRKpSV-COOH	1	TASK-3	1433 мутант+пептид+Fc	1.70 Å
3P1R	KRRKpSV-COOH	1	TASK-3	1433 мутант+пептид	1.70 Å
3P1S	KRRKpSV-COOH	1	TASK-3	1433 мутант+пептид+Fc	1.65 Å
3SMK	KRRKpSV-COOH	1	TASK-3	1433 мутант+пептид+cotA	2.10 Å
3SML	KRRKpSV-COOH	1	TASK-3	1433 мутант +пептид+производное Fc	1.90 Å
3SMN	KRRKpSV-COOH	1	TASK-3	1433 мутант+пептид +производное Fc	2.00 Å
3SP5	KRRKpSV-COOH	1	TASK-3	1433 мутант +пептид+производное cotA	1.80 Å
3SPR	KRRKpSV-COOH	1	TASK-3	1433 мутант +пептид+производное Fc	1.99 Å
3UX0	KRRKpSV-COOH	1	TASK-3	1433 мутант+пептид +производное Fc	1.75 Å
6GHP	KRRKpSV-COOH	1	TASK-3	1433 мутант +производное Fc	1.95 Å
3SMM	KRRKpSV-COOH	1	TASK-3	1433 мутант +производное Fc	2.00 Å
3SMO	KRRKpSV-COOH	1	TASK-3	1433 мутант +производное Fc	1.80 Å
4FR3	KRRKpSV-COOH	1	TASK-3	1433 мутант +производное Fc	1.90 Å
4JC3	GFPpTV-COOH	1	ERα	1433+пептид	2.05 Å
4JDD	GFPpTV-COOH	1	ERα	1433+пептид+Fc	2.10 Å
5N10	GFPpTV-COOH	1	ERα	1433+пептид+кольцевой стабилизатор	1.60 Å
6HHP	GFPpTV-COOH	1	ERα	1433+пептид+стабилизатор 1	1.80 Å
6HMT	GFPpTV-COOH	1	ERα	1433+пептид+стабилизатор 2	1.10 Å
6HKB	GFPpTV-COOH	1	ERα	1433+пептид+стабилизатор 3	1.70 Å
6HKF	GFPpTV-COOH	1	ERα	1433+пептид+стабилизатор 4	1.80 Å
6HN2	GFPpTV-COOH	1	ERα	1433+пептид+стабилизатор 5	1.70 Å
6HMU	GFPpTV-COOH	1	ERα	1433+пептид+стабилизатор 6	1.20 Å
6W0L	SMRRpSM-COOH	1	Белок W генипавируса	1433 + пептид	2.30 Å
4O46	<u>RTARpSKV-COOH</u>	2	Белок NS1 вируса гриппа	1433 + пептид	2.90 Å
6T80	<u>LRRNpSGC-COOH</u>	2	AANAT	Химера 1433σ	2.99 Å

3.2.2.7. Дизайн и применение химерной конструкции 14-3-3σ с фосфорилированным белком HSPB6 для структурных исследований

Мы показали, что химерные конструкции на основе 14-3-3 полезны и удобны для получения структурной информации о комплексах 14-3-3, причем такой подход показал свою состоятельность как минимум с несколькими изоформами 14-3-3, а также с целым рядом различных фосфопептидов. Ввиду склонности фосфорилируемых фрагментов, содержащих 14-3-3-связывающие сайты, к структурной разупорядоченности [32, 161, 498, 611], а также из-за их первичной роли в связывании 14-3-3, изучение комплексов 14-3-3 с белками-партнерами в настоящее время зачастую сводится именно к изучению белок-пептидных комплексов [144, 157, 169, 263, 596, 612, 613]. Однако, как мы показали выше, наряду с первичными взаимодействиями, вторичные контакты могут также иметь значение для сборки белковых комплексов (Рис. 50).

Для того чтобы проверить применимость химерных конструкций для исследования взаимодействий с 14-3-3 в контексте всего белка-партнера, мы попытались создать и охарактеризовать химеру 14-3-3σ с белком B6. Учитывая N-концевое расположение 14-3-3-связывающего мотива в первичной структуре B6 (общая черта многих партнеров 14-3-3) и нативную 2:2 стехиометрию комплекса 14-3-3/рB6, дизайн новой химеры (Рис. 83А) основывался на конструкции химеры 14-3-3σ с фосфорилируемым пептидом белка B6, который, как мы показали, связывается в АБ 14-3-3 в правильной конформации (Рис. 59 и Рис. 62). Таким образом, в полной химере, которую мы назвали «14-3-3-рB6», С-конец фосфопептида LRRApS¹⁶APL был продлен до остатка 153 белка, чтобы захватить практически весь неструктурированный NTD и β-складчатый α-кристаллиновый (АКД) домены. При этом короткий гибкий С-концевой сегмент B6 (остатки 154-160), который не принципиален для его взаимодействия с 14-3-3 (Рис. 42), не был включен, так как мог усложнить структурные исследования. При переносе логики построения уже охарактеризованной нами ранее химеры рСН1 последовательность белка B6, присоединенная к 14-3-3σ, начиналась с остатка Leu12 (Рис. 83А).

Спроектированная белок-белковая химера показала хорошую экспрессию в клетках *E.coli* в растворимой форме в присутствии или в отсутствие РКА, а наличие отщепляемого гис-тага позволило эффективно очистить ее с помощью вычитающей металлоаффинной хроматографии и гель-фильтрации, аналогично подходу, описанному для пептидных химер (Рис. 83Б). Нефосфорилированная версия давала гораздо более высокий выход и могла быть

эффективно фосфорилирована с помощью РКА *in vitro* (Рис. 83В). В результате, мы показали, что миллиграммовые количества электрофоретически гомогенного химерного фосфобелка могут быть получены за три дня, включая экспрессию. По всей видимости, присутствие 14-3-3 обеспечивает хорошую растворимость, давая определенное преимущество при использовании и других белков-партнеров в составе химер с 14-3-3. Улучшение растворимости белков при связывании с 14-3-3 известно с 1996 года [253].

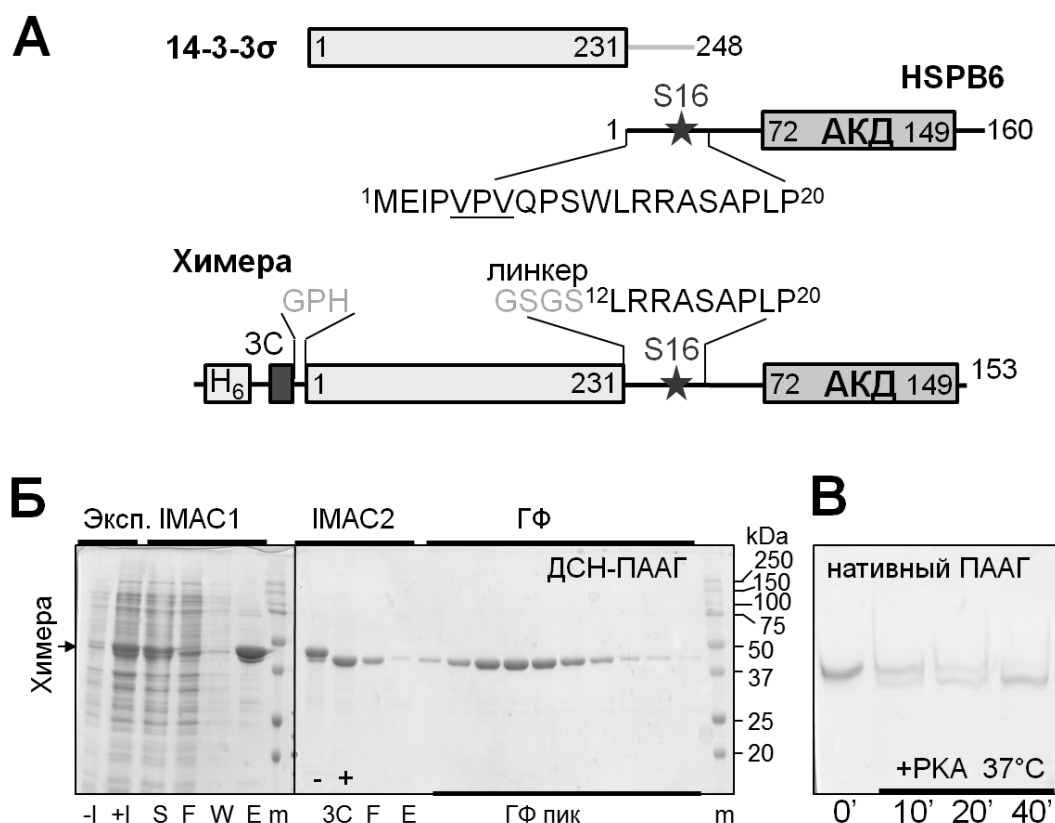


Рис. 83. Конструкция и очистка химеры 14-3-3σ-pB6. А. Схемы, показывающие первичную структуру отдельных белков и химеры. Показан N-концевой гис-таг, отщепляемый 3С протеазой. Б. Экспрессия (Эксп.) и хроматографическая очистка (IMAC1, IMAC2, ГФ) нефосфорилированной химеры, по данным ДСН-электрофореза. Аналогичные результаты были получены после ко-экспрессии с РКА, но с более низким выходом. Проба до (-I) и после индукции экспрессии (+I), растворимая фракция (S), проскок (F), промывка (W), элюат (E) и фракции, собранные во время ГФ (ГФ пик), указаны внизу геля. Белковые маркеры (m) с соответствующими массами (в кДа) также указаны. Положение полосы химеры показано стрелкой слева. Отмечен сдвиг после протеолиза 3С (3С: «-», «+»). В. Кинетика *in vitro* фосфорилирования очищенной химеры с помощью РКА, по данным нативного электрофореза. Смещение вниз происходит из-за включения фосфатной группы.

Олигомерное состояние нефосфорилированной и фосфорилированной версий химеры было исследовано с помощью ГФ при различных концентрациях белка (Рис. 84А и Б). Важно

отметить, что при низкой концентрации белка оба варианта на профиле элюции показывали один симметричный пик с кажущейся молекулярной массой ~ 85 кДа. Фосфорилированная версия имела чуть более низкое значение кажущейся массы, что, вероятно, связано с тем, что фосфорилирование приводит к связыванию фосфопептидов В6 в АБ 14-3-3 и, следовательно, к компактизации белка, аналогично тому, как наблюдалось для пептидных химер. При более высоких концентрациях начал появляться второй пик с кажущейся молекулярной массой 157-168 кДа, который снова имел чуть более компактный размер частиц для фосфорилированной химеры, и в этом случае амплитуда также была заметно выше (Рис. 84А и Б). Эти данные хорошо согласуются с теоретическими значениями для димера и тетрамера химеры ($M_w = 83,4$ кДа и $166,8$ кДа, соответственно). Более точные оценки MW химеры 14-3-3-pВ6 были получены при ГФ с детекцией MALLS: были обнаружены два пика с $M_w = 82,8$ (массовая доля 76,1%) и $M_w = 143,8$ кДа (массовая доля 23,9%) (Рис. 84В). Первый пик с незначительной полидисперсностью ($\pm 1,05\%$) почти идеально соответствовал димеру, а второй, по всей видимости, соответствовал тетрамеру химеры (Рис. 84В).

Природные белки 14-3-3 образуют хорошо растворимые и довольно стабильные димеры, удерживаемые обширными контактами с участием N-концевых α -спиралей [72, 73, 114]. Присоединенный к С-концу белок-партнер вряд ли будет влиять на димеризацию и сворачивание ядра 14-3-3, однако остается вопрос, остается ли АКД в химере свернутым так, как в нативном белке В6, олигомерный статус которого определяется димеризацией АКД [313, 348]. Поскольку наиболее стабильным олигомером высшего порядка является димер как для 14-3-3 σ , так и для АКД, мы предположили, что наблюдаемая тетрамеризация химеры происходит путем обмена доменами с сохранением интерфейсов димера 14-3-3 и димера АКД. Подобный обмен наблюдался в некоторых кристаллических структурах пептидных 14-3-3 химер и возможен только в том случае, если в составе химеры как димер 14-3-3, так и димер АКД правильно свернуты и демонстрируют присущую им склонность к димеризации (Рис. 85А и Б). Если АКД теряет свою склонность к димеризации, то максимально возможным олигомером всегда будет димер, соединенный через межсубъединичные контакты в 14-3-3 (Рис. 85В). Эти данные указывают на то, что 14-3-3 и АКД части (домены) являются правильно свернутыми в полученной химере, что было целесообразно подтвердить с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и ограниченного протеолиза.

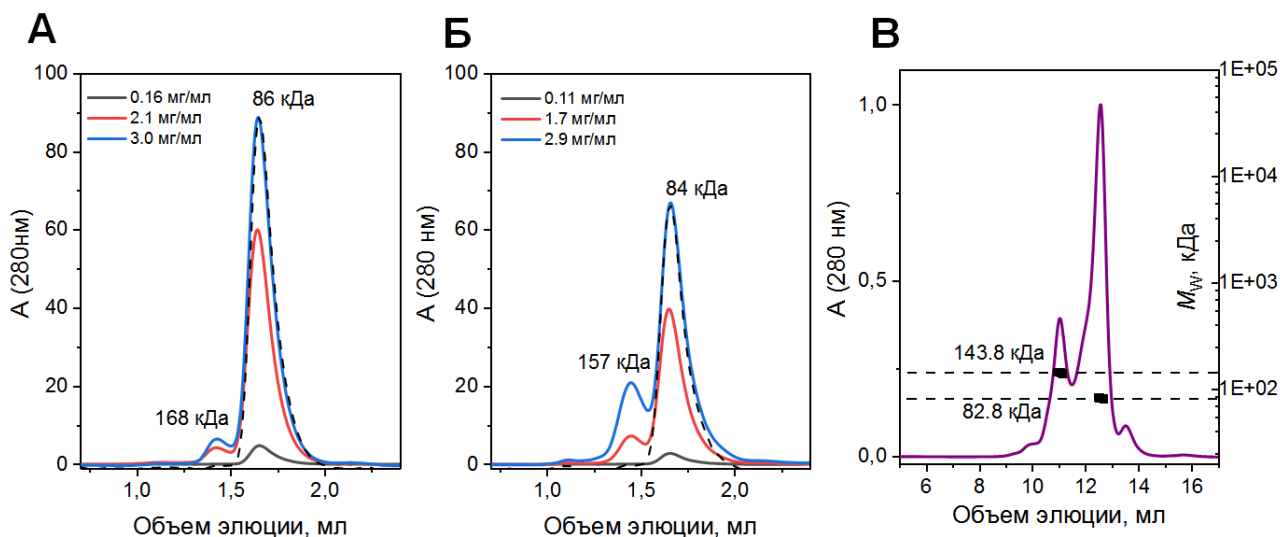


Рис. 84. Олигомерное состояние химеры 14-3-3-рВ6. Профили ГФ нефосфорилированной (А) и РКА-фосфорилированной (Б) химеры с колонки Superdex 200 Increase 5/150 при скорости потока 0,45 мл/мин для различных концентрациях белка в наносимом образце. Значения M_w пиков определяли из калибровки колонки. Пунктирные линии показывают профили наименьшей концентрации, масштабированные до основного пика профилей наибольшей концентрации. В. Абсолютные значения M_w для двух основных пиков 14-3-3-рВ6, полученных при ГФ на колонке Superdex 200 Increase 10/300 при скорости потока 0,5 мл/мин с помощью детекции многоугольного лазерного светорассеяния (MALLS).

Метод ДСК использовали для изучения тепловой денатурации химеры и для проверки наличия свернутых доменов в ее структуре, исследуя в качестве контроля отдельные димеры 14-3-3 и В6. В соответствии с предыдущими данными [134, 217], термограмма для димера 14-3-3 показала кооперативный переход с $T_m = 61,9$ °С, тогда как В6 выявил переход с более высоким T_m , равным 65,8 °С (Рис. 86). Химера денатурировала по меньшей мере в две стадии, показывая два отчетливых пика на термограмме, характеризующихся значениями T_m , равными 64,2 и 66,9 °С. Принимая во внимание, что связывание с фосфорилированным лигандом увеличивает термостабильность 14-3-3 ([614] и Рис. 61Б), мы предполагаем, что первый пик соответствует ядру 14-3-3, связанному с фосфопептидом, тогда как второй, плохо отделенный пик, скорее всего, соответствует димеру АКД, который стабилизируется на 1,1 °С за счет ковалентного присоединения к ядру 14-3-3 и возможных внутримолекулярных взаимодействий в пределах химеры. Таким образом, данные ДСК указывают на то, что димер АКД свернут в химере, и связывание фосфопептида стабилизирует ядро 14-3-3.

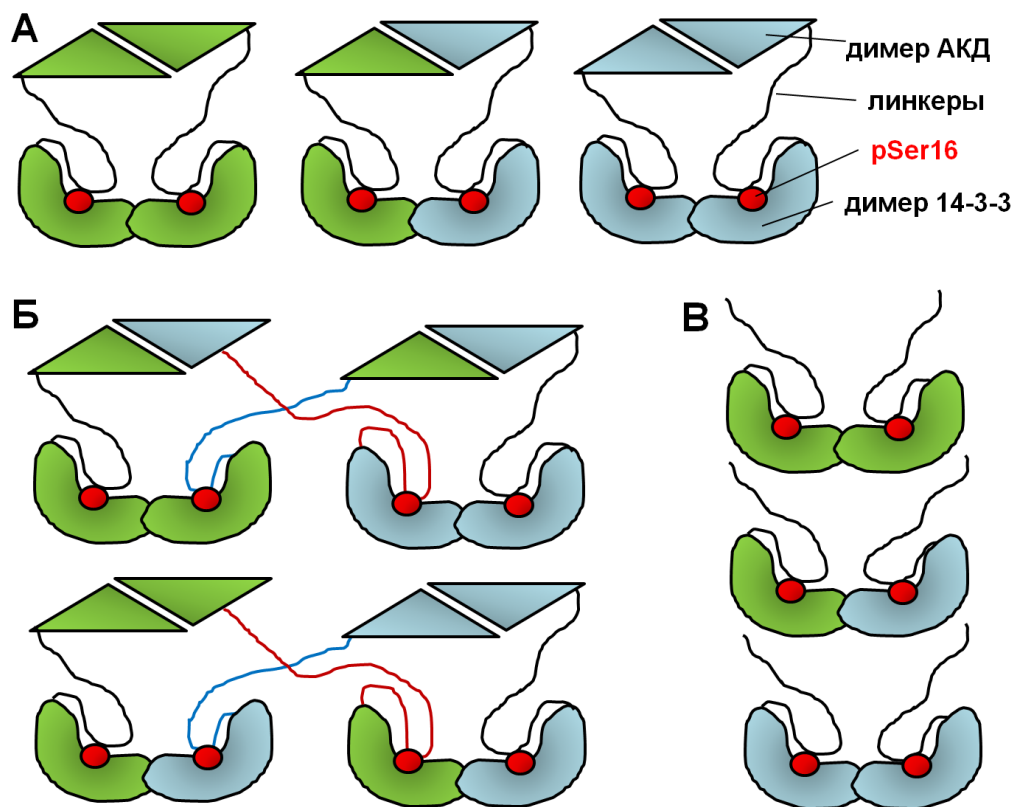


Рис. 85. Возможные способы стабилизации гетеротетрамерной формы химеры 14-3-3-pV6. А Два гомодимера химеры могут обмениваться мономерами целиком, образуя гетеродимер. Б. В случае, если обмен частичный (либо АКД, либо 14-3-3 меняют партнера), образуется гетеротетрамерная сборка. В. В случае, если АКД неправильно свернут и не может образовывать свойственные ему димеры, максимально возможный порядок олигомера – димер, и тетрамеры не могут быть стабилизированы.

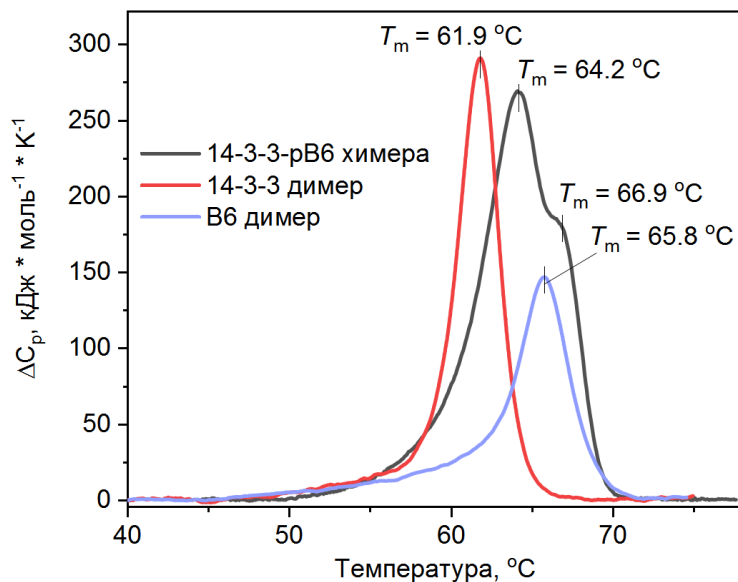


Рис. 86. Анализ наличия свернутых доменов в химере 14-3-3-pV6 методом ДСК. Образцы, содержащие димер 14-3-3, димер V6 или химеру 14-3-3-pV6, подвергали ДСК при постоянной скорости нагревания 1 К/мин. Температуры теплового перехода для пиков (T_m) указаны как положения их максимума.

Ограниченный трипсинолиз химеры 14-3-3-pB6 (~ 42 кДа) приводил к медленному исчезновению начальной полосы с одновременным накоплением двух полос со значениями кажущейся Mw, соответствующими таковым для 14-3-3σΔC и B6ΔN56 (~ 26 и ~ 11 кДа, соответственно) (Рис. 87). Из-за наличия нескольких остатков Arg в NTD белка B6 между ядром 14-3-3 и АКД (например, Arg27, Arg32, Arg56), которые являются участками расщепления для трипсина (Рис. 43), также был обнаружен ряд промежуточных продуктов расщепления с массами между 42 и 26,5 кДа (Рис. 87). Полоса 26,5 кДа остается устойчивой к дальнейшему трипсинолизу в соответствии с известной стабильностью 14-3-3 димеров ([292, 362, 615] и Рис. 43).

Основной сайт химотрипсинолиза B6 находится в дипептиде Tyr53-Tyr54 в неупорядоченном NTD, а АКД более устойчив к расщеплению [134]. Инкубация химеры 14-3-3-pB6 с химотрипсином приводила к накоплению пептидов ~ 11-12 кДа, соответствующих фрагментам B6 54-153 (10,8 кДа) и 33-153 (12,8 кДа). Остальная часть химеры накапливалась на геле в виде ~ 30 кДа и ~ 26 кДа продуктов, превышающих и соответствующих по размеру 14-3-3σΔC (~ 26 кДа), соответственно (Рис. 87). Это соответствует расщеплению по остаткам Phe33 или Tyr53/54 в NTD сегменте B6. Таким образом, относительная устойчивость частей 14-3-3 и АКД к трипсинолизу и химотрипсинолизу еще раз подтверждает свернутость этих доменов в составе химеры.

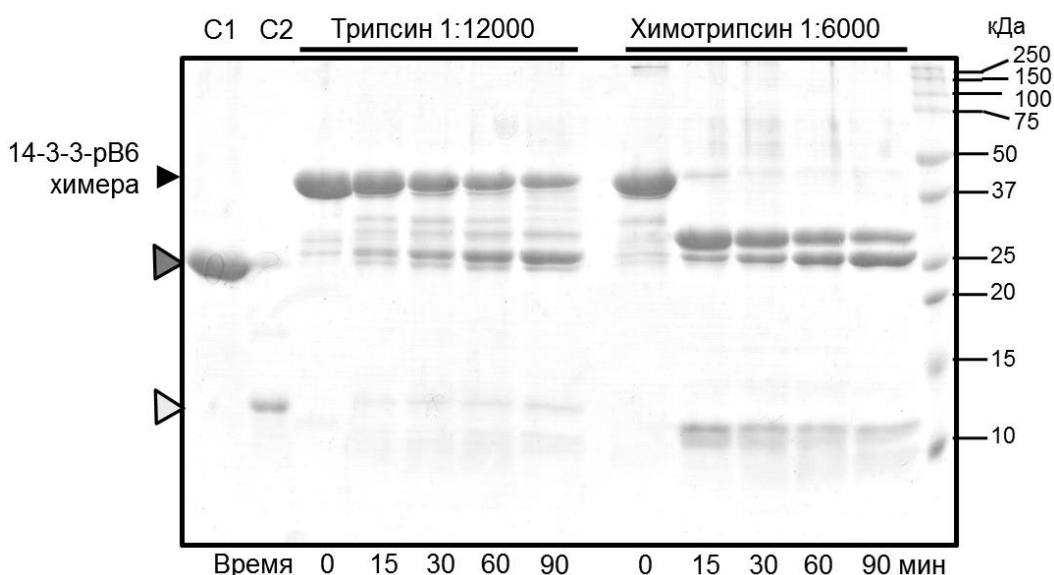


Рис. 87. Кинетика расщепления химеры 14-3-3-pB6 трипсином или химотрипсином при 37 °C при указанных соотношениях протеаза:субстрат. Моменты времени отбора проб указаны внизу геля (мин). Положение полос интактной химеры и белковых маркеров (в кДа) показано стрелками. C1 и C2 соответствуют контрольным полоскам 14-3-3σΔC (26,1 кДа, темный треугольник) и усеченному с N-конца варианту B6.57-160 (11,0 кДа, светлый треугольник).

С учетом того, что химеризация не мешает сворачиванию доменов 14-3-3 и АКД внутри химеры, возникает вопрос об их взаимодействии. Изолированный димер В6 АКД (остатки 72-149) был ранее использован нами для проверки этого предположения и не показал способности образовывать прочные комплексы с 14-3-3σΔС (Рис. 47). Однако мы предполагали, что пластичность конформации 14-3-3 в отсутствие связывания фосфопептидов в АБ (Рис. 37) может осложнять образование интерфейса АКД с С-концевыми α-спиралями 14-3-3, который наблюдается в кристаллической структуре полного комплекса с АБ, занятыми фосфопептидами (Рис. 42). Располагая структурными данными о пептидной химере рСН1, в которой АБ также заняты фосфопептидами В6 (Рис. 62), мы решили проверить взаимодействие В6 АКД не с 14-3-3σΔС, а с химерой рСН1.

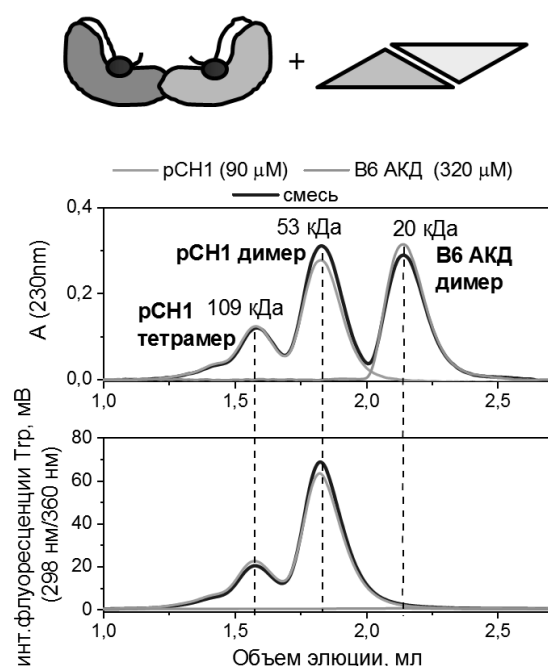


Рис. 88. Изолированный В6 АКД не взаимодействует с химерой 14-3-3σ с фосфопептидом белка В6, рСН1. Этот сценарий, схематически показанный сверху, был исследован методом ГФ с одновременной детекцией оптической плотности при 230 нм и триптофановой флуоресценции (возбуждение 298 нм, эмиссия 360 нм). Концентрации 14-3-3 и В6 АКД указаны в μМ. Пунктирные линии показывают положение основных пиков на разных профилях.

Мы воспользовались отсутствием остатков триптофана в АКД и их наличием в ядре 14-3-3 в химере рСН1 и провели гель-фильтрацию с флуоресцентной детекцией (Рис. 88). Как и ожидалось, АКД элюировался в виде димера с кажущейся Mw 20 кДа, тогда как химера рСН1 демонстрировала димеры (~ 53 кДа), а также тетрамеры (~ 109 кДа), образованные из-за обмена соседних димеров фосфопептидами (см. Рис. 61). В этом случае

нам также не удалось обнаружить какого-либо прямого связывания между 14-3-3 и АКД даже при нагрузке на колонку очень высоких концентраций индивидуальных белков. Это говорит о том, что этот вторичный интерфейс 14-3-3/АКД сам по себе чрезвычайно нестабилен, но может образовываться в нативном комплексе из-за многоточечных стабилизирующих контактов, наблюдаемых в кристаллической структуре (Рис. 89А). Наиболее интересно было выяснить, насколько стабилен такой вторичный интерфейс в составе полноразмерной химеры 14-3-3-рВ6 (Рис. 89Б). Для этого мы воспользовались методом ГФ с детекцией MALLS и синхротронного МУРР, анализируя данные исключительно для димерного пика химеры (профиль приведен на Рис. 84В), который соответствует нативному комплексу со стехиометрией 2:2.

Табл. 29. Структурные параметры химеры 14-3-3-рВ6, определенные в эксперименте ГФ-МУРР на синхротроне DESY в Гамбурге. *Подгонка в *CRY SOL* [416] для описания экспериментальных данных МУРР для лучшей модели с нефиксированным интерфейсом 14-3-3/АКД, построенной с помощью программы *CORAL*. *Примечание:* *GNOM*, *DATPOROD*, *DATMOW*, *DATVC* и *CRY SOL* входят в состав программного пакета *ATSAS 2.8* [414, 424, 616]. Для расчета массы также использовалась программа *SAXSMOW* [617].

<i>Параметры</i>	<i>Значения для химеры 14-3-3-рВ6</i>
Анализ Гинье	
$I(0)$ (см ⁻¹)	652,5 ± 1,0
R_g (нм)	3,51 ± 0,01
диапазон sR_g	0,34 < sR_g < 1,30
Анализ распределения $p(r)$	
$I(0)$ (см ⁻¹)	654,9 ± 1,0
R_g (нм)	3,57 ± 0,02
D_{max} (нм)	12,5
диапазон s (нм ⁻¹)	0,0969-2,2797
Анализ объема, формы и массы (M_w)	
Объем Порода, нм ³	141,4
M_w рассчитанная по последовательности, кДа	41,7*2 = 83,4
M_w из данных ГФ-MALLS, кДа (отношение к расчетной массе)	82,8 (0,99)
M_w из объема Порода, кДа (отношение к расчетной массе)	88,1 (1,06)
M_w из расчета в <i>SAXSMOW</i> , кДа (отношение к расчетной массе)	76,9 (0,92)
M_w из объема корреляции V_c , кДа, (отношение к расчетной массе)	84,2 (1,01)
Анализ гидродинамических свойств из ГФ-MALLS	
Гидродинамический радиус, R_h (нм)	4,18
R_g / R_h соотношение (значение для сферической частицы)	0,84 (0,78)
Результат подгонки в <i>CRY SOL</i>	
Диапазон s использованный для подгонки	0,093–5
χ^2	1,16*
R_g модели (нм)	3,50

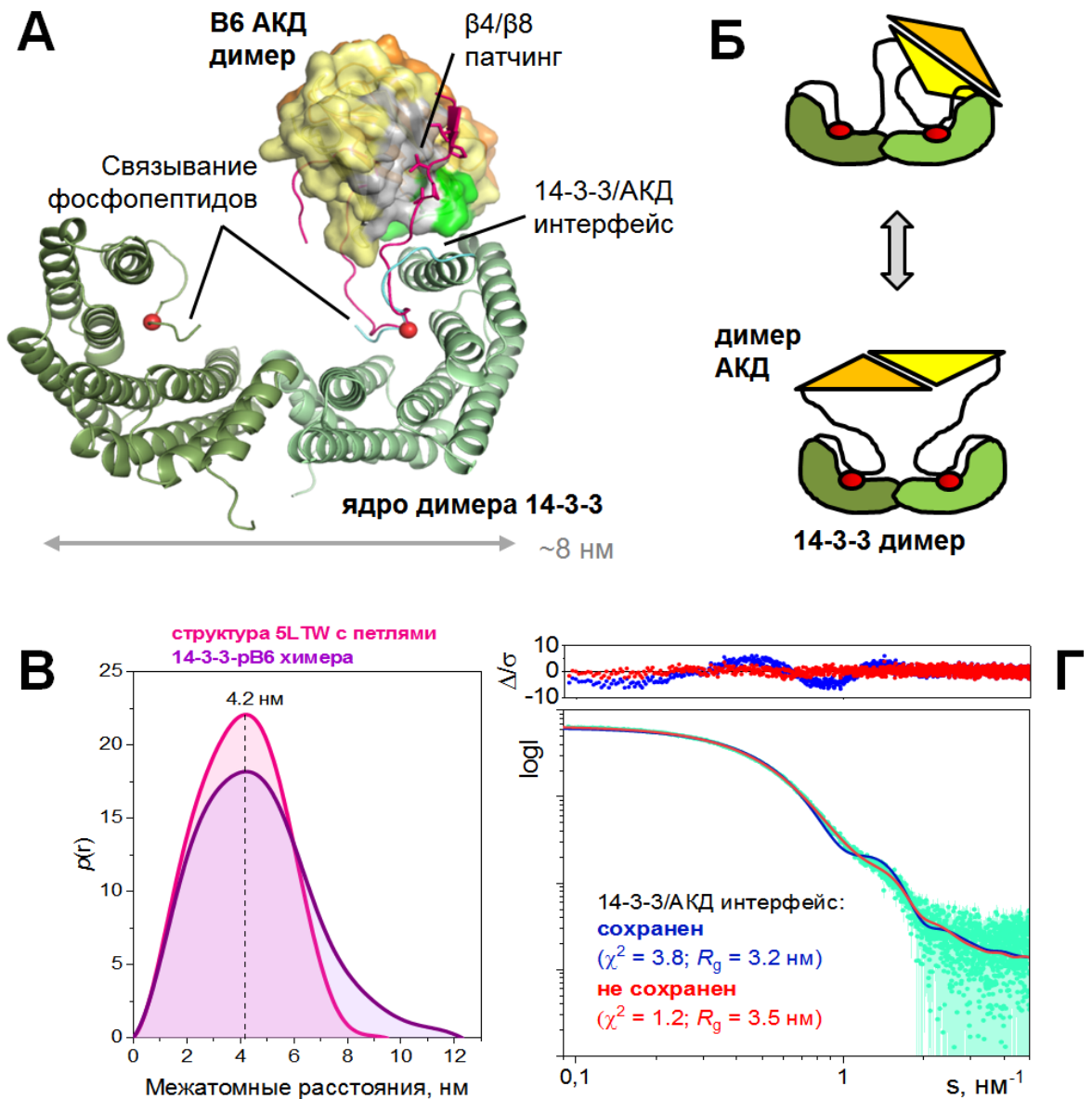


Рис. 89. Исследование конформации химеры 14-3-3-pV6 в растворе с помощью МУРР. А. Прототип химеры, имитирующий кристаллографическую структуру комплекса 14-3-3σ/pV6 (код PDB 5LTW) с сохранением интерфейса 14-3-3/В6 АКД. Фосфосерины показаны красными сферами. Конструкция химеры не включала N-концевой пептид В6, взаимодействующий с бороздкой β4/β8 в АКД, что наблюдается в структуре 5LTW. Б. Схема, показывающая, что в отсутствие указанного взаимодействия с β4/β8 бороздкой интерфейс 14-3-3/АКД может сохраняться или нет. В. Сравнение функций $p(r)$ для химеры (экспериментальные данные МУРР, обработанные в программе *GNOM* [424]) и для структуры 5LTW, дополненной отсутствующими петлями. Распределения $p(r)$ вычислены с помощью программ *CRY SOL* [416] и *GNOM* [424]. Г. Результаты описания экспериментальных данных МУРР для каждой из двух моделей в зависимости от того, сохраняется ли интерфейс 14-3-3/АКД. Значения остатков (Δ/σ) при подгонке показаны сверху.

Результаты исследования структурных свойств химеры 14-3-3-pB6 в растворе приведены в Табл. 29 и на Рис. 89. Профиль МУРР показал линейность области Гинье, что указывало на отсутствие аномального поведения образца и выраженной агрегации или отталкивания частиц. Оценки M_w по данным МУРР хорошо согласовывались с данными, полученным из MALLS (Табл. 29). Функция распределения межатомных расстояний $p(r)$, рассчитанная по профилю МУРР химеры, показала кривую, похожую по форме на кривую, рассчитанную по полноатомной модели комплекса 14-3-3 σ AC-pB6 Δ C со стехиометрией 2:2 (Рис. 89В). Однако в случае химеры правая часть графика простиралась дальше вдоль оси X до более высоких значений D_{max} (12,5 нм в химере по сравнению с 10 нм в случае комплекса), давая также более высокое значение R_g ($3,51 \pm 0,01$ нм для химеры против $3,13 \pm 0,02$ нм для комплекса). Ввиду монодисперсности образца и линейности диапазона Гинье мы могли провести моделирование структуры димера химеры в растворе на основе данных МУРР и доступных кристаллографических структур в *CORAL* [414].

При моделировании ядро 14-3-3 (pCH1) и димер B6 АКД рассматривались как твердые тела, соединенные гибкими сегментами, соответствующими линкерам и B6 NTD. Моделирование при фиксированном относительном положении ядра 14-3-3 и димера АКД, имитирующем структуру 5LTW, привело к удовлетворительному описанию данных МУРР (наилучшее значение $\chi^2 = 3,8$ на всем диапазоне данных рассеяния), однако наблюдались некоторые различия между расчетными и экспериментальными профилями рассеяния (Рис. 89Г). Меньший размер таких моделей ($R_g \sim 3,2$ нм) недостаточно хорошо описывал часть экспериментального профиля МУРР при малых углах, которая указывала на менее компактный размер частиц ($R_g \sim 3,5$ нм) (Рис. 89Г). Эти результаты соответствуют различиям, наблюдаемым на графиках $p(r)$ (Рис. 89В). При диссоциации интерфейса 14-3-3/АКД (Рис. 89Г и Рис. 90) нам получить большие по размеру модели с различным положением АКД относительно ядра 14-3-3, что уменьшило неувязку и обеспечило полное соответствие экспериментальному профилю МУРР на всем диапазоне данных рассеяния (χ^2 для отдельных моделей варьировал от 1,16 до 1,27). Это означало, что в молекулах химеры 14-3-3-pB6 интерфейс 14-3-3 и АКД не является стабильным даже несмотря на локально высокую концентрацию АКД вблизи 14-3-3 и компактизацию 14-3-3 при связывании с фосфопептидами B6 в составе химеры. Мы предполагаем, что этот интерфейс частично сохраняется в одной популяции моделей, а в другой – нарушен.

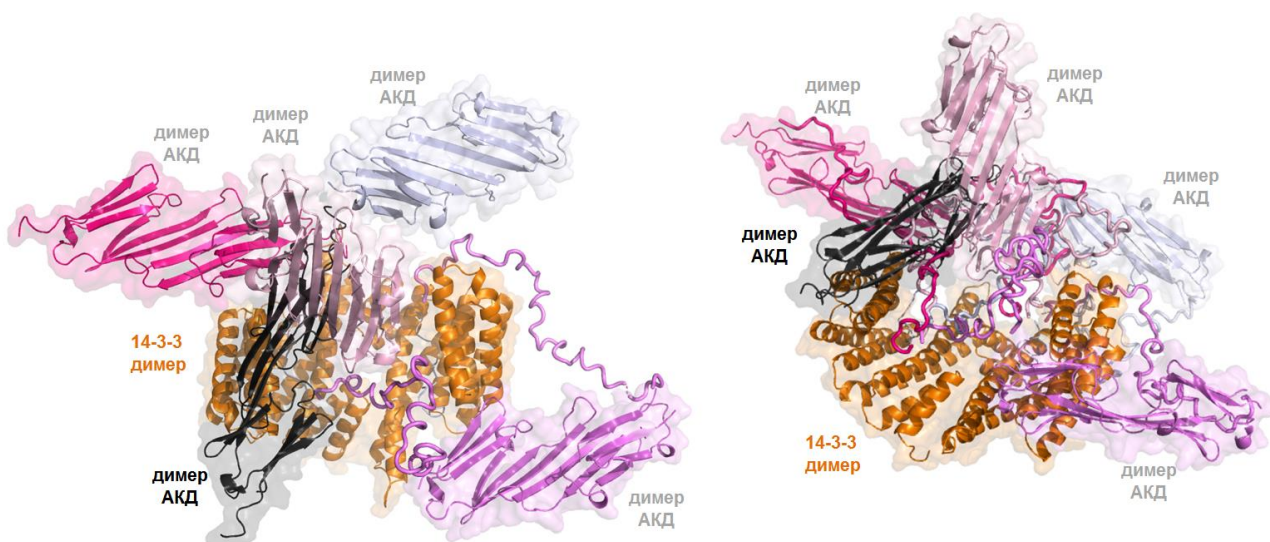


Рис. 90. Ансамбль моделей, описывающих структуру химеры 14-3-3-pV6 в растворе, полученный в результате моделирования на основе данных МУРР и показанный в двух ракурсах. Димер 14-3-3 показан оранжевым, кроме него отмечено 5 различных положений АКД – связанного с С-концевыми α -спиралями 14-3-3 как в кристаллической структуре (черный цвет надписи и структуры), или диссоциированного от 14-3-3 (серые надписи, различные цвета).

Таким образом, несмотря на то, что полученная химера воспроизводит многие особенности нековалентного комплекса двух белков и может быть использована для структурных исследований, в том числе, направленных на оценку силы вторичных взаимодействий, она, по-видимому, является более динамичной, чем нативный комплекс. Главным образом, это касается интерфейса 14-3-3 и АКД, который в кристаллической структуре полного комплекса составляет около 400 \AA^2 и имеет солевой мостик между остатком Arg224 14-3-3 и Glu86 АКД (Рис. 41). Данные ГФ говорят о том, что этот интерфейс довольно нестабилен, так как изолированный димер В6 АКД не связывается ни с димером 14-3-3 (Рис. 47), ни с димером 14-3-3 со связанными фосфопептидами В6 (Рис. 88). Это согласуется с предыдущими наблюдениями о том, что полноразмерный нефосфорилированный белок В6 не взаимодействует с 14-3-3 [132, 199, 333].

Тем не менее, кристаллическая структура комплекса 14-3-3/pV6 указывает на особую роль N-концевого пептида В6 (остатки 2-10), содержащего мотив VPV [313], который связывается с бороздкой $\beta 4/\beta 8$ в АКД, притягивая весь АКД к 14-3-3 за счет закоривания, которое происходит при связывании фосфопептида В6 (остатки 10-20) в АБ субъединицы 14-3-3 (Рис. 42). Такое двухцентровое связывание сегмента 2-20 белка В6 значительно ограничивает положение АКД относительно соседней молекулы 14-3-3. В химере же С-конец 14-3-3 связан с последовательностью В6, начинающейся только с остатка Leu12 (Рис.

83А), что делает невозможной стабилизацию АКД на поверхности 14-3-3, как это наблюдается в структуре полного комплекса (Рис. 42). В соответствии с этим, наши данные о структуре химеры в растворе указывают на динамичность ассоциации-диссоциации интерфейса 14-3-3/АКД и, вместе с кристаллографическими данными, подчеркивают многоточечный характер взаимодействия этих белков и сложную иерархию стабилизирующих факторов.

Мы полагаем, что химерный подход может быть с осторожностью применен и к другим белковым партнерам 14-3-3, характеризующимся одиночными 14-3-3-связывающими фосфопептидами, расположенными на N-конце. Более того, использование изоформ 14-3-3, способных к гетеродимеризации, может позволить охарактеризовать тройные комплексы, опосредованные через димер 14-3-3. Помимо ко-экспрессии с соответствующей протеинкиназой, гетеродимерные химеры могут быть фосфорилированы *in vitro* или с использованием ко-трансляционного включения остатков серина на местах TAG кодонов при оптимизации кодонной супрессии [532, 618].

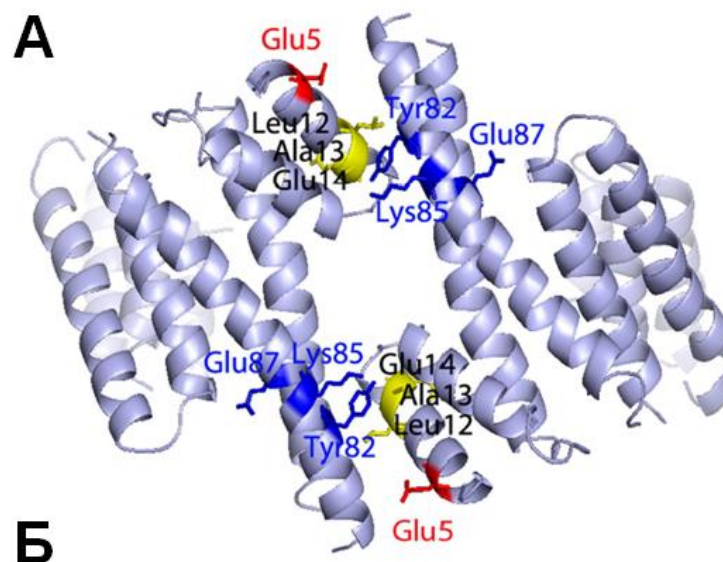
3.3. Мономеризация и шапероно-подобная активность 14-3-3

3.3.1. Получение и характеристика мономерной мутантной формы 14-3-3 ζ

Большинство функций требует димерной конформации 14-3-3 [117, 233, 514], однако известно, что продукты альтернативного сплайсинга некоторых 14-3-3, укороченные с N-конца, являются мономерными и сохраняют некоторую функциональность [619]. Кроме того, протеомные исследования выявили довольно стабильные укороченные формы 14-3-3 β , 14-3-3 ζ и 14-3-3 τ , лишенные ответственных за димеризацию N-концевых областей белка [620]. Нельзя исключить наличия у мономеров уникальных свойств, однако проверка этой гипотезы невозможна без получения и характеристики мономеров. Помимо альтернативного сплайсинга и протеолиза было показано, что фосфорилирование Ser58 нескольких изоформ 14-3-3, таких как 14-3-3 ζ , дестабилизирует димер и провоцирует его диссоциацию [117-119, 209, 211, 621]. Фосфорилирование Ser58 в димере затруднено его расположением в области димеризации и приводит лишь к частичной диссоциации 14-3-3, поэтому такая модификация не может быть использована для получения мономеров 14-3-3 и исследования их свойств [217]. В этой связи, для получения мономеров белка мы получили серию мутантных форм с заменами в области димеризации (Рис. 91).

Первая мутантная форма 14-3-3, сконструированная для исследования роли мономеров 14-3-3 в регуляции Raf киназы [233], содержала 7 замен, расположенных на межсубъединичной поверхности димера 14-3-3 ζ (Рис. 91). Ввиду расположения этих 7 остатков в трех участках (остаток 5, остатки 12-14 и остатки 82-87), такая форма может быть обозначена MMM, начиная с N-конца (тогда исходная форма – WWW, W – дикий тип). Мутантные формы типа WMM, WWM или WMW были использованы для проверки некоторых гипотез о функциях мономеров в ряде других исследований [514, 622, 623]. Однако все эти исследования были выполнены на клеточном уровне без предварительного изучения физико-химических свойств этих мутантных форм и правильности их сворачивания.

Несмотря на варьирование условий экспрессии, мутантные формы 14-3-3 ζ MMM и WMM были полностью нерастворимы в клетках *E.coli*, указывая на невозможность правильного сворачивания в бактериальной системе. Пытаясь улучшить растворимость, мы получили так называемые варианты WMW и MMW (Рис. 91). Эти белки действительно были успешно экспрессированы в растворимой форме в *E.coli*, очищены до гомогенности и использованы для исследования структуры и физико-химических свойств предполагаемых мономеров 14-3-3.



Вариант 14-3-3ζ	Замены в интерфейсе 14-3-3ζ			Число замен	Растворимость (E.coli)
	положение	участок	участок		
MMM	<u>5</u>	<u>12-14</u>	<u>82-87</u>	7	--
WMM	E	<u>QQR</u>	<u>QRENIQ</u>	6	-
MMW	<u>K</u>	<u>QQR</u>	YREKIE	4	++
WMW	E	<u>QQR</u>	YREKIE	3	++
WWW (WT)	E	LAE	YREKIE	0	+++

Рис. 91. Дизайн вариантов белка 14-3-3ζ, не способных к димеризации. А. Положение 7 остатков, расположенных в интерфейсе димеров 14-3-3ζ (код PDB 1A4O), мутирование которых дает вариант MMM. Мутированные остатки расположены в трех участках – остаток 5, остатки 12-14 и остатки 82-87. Б. Номенклатура полученных вариантов 14-3-3ζ. Мутированные остатки подчеркнуты, указана растворимость при экспрессии в *E.coli*.

Олигомерное состояние мутантных форм было исследовано с помощью ГФ в широком диапазоне концентрации белка. В соответствии с нашими предыдущими результатами [217], 14-3-3ζ WT элюировался в виде димерного пика с радиусом Стокса $36,6 \pm 0,1 \text{ \AA}$, положение которого не зависело от концентрации (Рис. 92А). Радиус Стокса 14-3-3ζ S58E менялся от 36 до 32 \AA при разведении, что отражало его концентрационно-зависимую диссоциацию (Рис. 92А). Белки MMW и WMW элюировались в виде одиночных пиков с радиусом Стокса $28,2 \pm 0,2 \text{ \AA}$ (Рис. 92А), при этом мы не наблюдали изменения положения их пиков в широком диапазоне концентраций белка (0,1-6,0 мг/мл). Для того чтобы точно определить олигомерное состояние, мы использовали ГФ с детекцией MALLS при довольно высокой концентрации белка 3 мг/мл (Рис. 92Б). Это позволило определить молекулярную массу пика равной $28,4 \pm 0,3 \text{ кДа}$, с индексом полидисперсности (M_w/M_n), не превышающим 1%. Расчетная молекулярная масса мономера 14-3-3ζ составляет 27,75 кДа, что очень близко

к экспериментально определенным значениям для белков WMW и MMW. Это означает, что белки WMW и MMW существуют в мономерной форме в очень широком диапазоне концентраций.

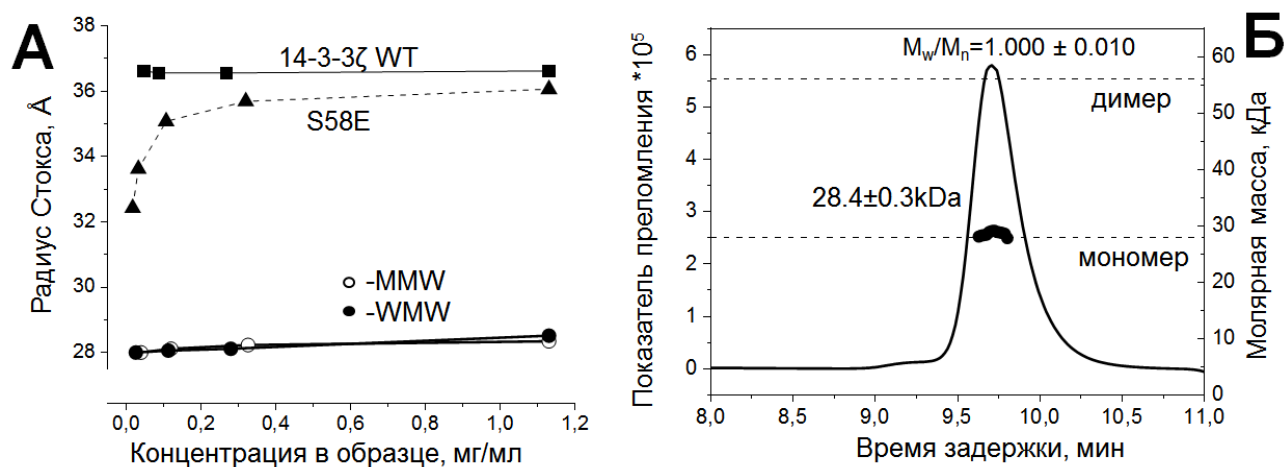


Рис. 92. А. Олигомерное состояние 14-3-3ζ WT и его вариантов WMW и MMW, в сравнении с ранее охарактеризованным белком S58E. Белки в концентрации от 0,01 до 1,15 мг/мл анализировали методом ГФ на колонке Superdex 200 10/300 (GE Healthcare), откалиброванной с помощью белков с известными радиусами Стокса. Б. Определение абсолютной молярной массы белка WMW (3 мг/мл) с помощью ГФ на колонке BioSep-SEC-S3000 (Phenomenex) и детекции многоуглового лазерного светорассеяния (MALLS). Показано распределение частиц по размерам с указанной средней массой и индексом полидисперсности (M_w/M_n). Пунктирные линии показывают расчетные значения масс димера и мономера 14-3-3ζ.

Диссоциация олигомерного белка должна сопровождаться экспонированием участков, скрытых в интерфейсе, при этом может меняться гидрофобность поверхности и стабильность высвобождающихся мономеров. Мы исследовали экспонирование области димеризации с помощью разных подходов. При регистрации триптофановой флуоресценции мы обнаружили, что максимум флуоресценции 14-3-3ζ WT был расположен при 342 нм, тогда как максимумы флуоресценции WMW и MMW были расположены при 346 и 348 нм, соответственно (Рис. 93А). При этом амплитуда собственной флуоресценции WMW ($133,7 \pm 10,9\%$) и MMW ($147,0 \pm 2,9\%$) была больше, чем амплитуда в случае белка дикого типа ($100,0 \pm 2,4\%$) (Рис. 93Б). Наблюдаемый красный сдвиг флуоресценции в случае мономерных мутантных форм указывает на большую экспонированность остатка(ов) триптофана [624]. В 14-3-3ζ имеется два остатка триптофана в каждом мономере, которые расположены в области димеризации (Trp59) и С-концевой области (Trp228) белка (Рис. 93В). Согласно данным литературы, консервативный Trp59 дает основной вклад в собственную флуоресценцию 14-3-3 [625]. В свете этого, наши экспериментальные данные подтверждают

диссоциированное состояние белков WMW и MMW, которое характеризуется экспонированием остатка Trp59 вблизи димерного интерфейса. Увеличение амплитуды собственной флуоресценции вариантов WMW и MMW по сравнению с белком дикого типа может быть связано с удалением некоторого внутримолекулярного тушителя (например, остатка с заряженной боковой группой) при расхождении субъединиц.

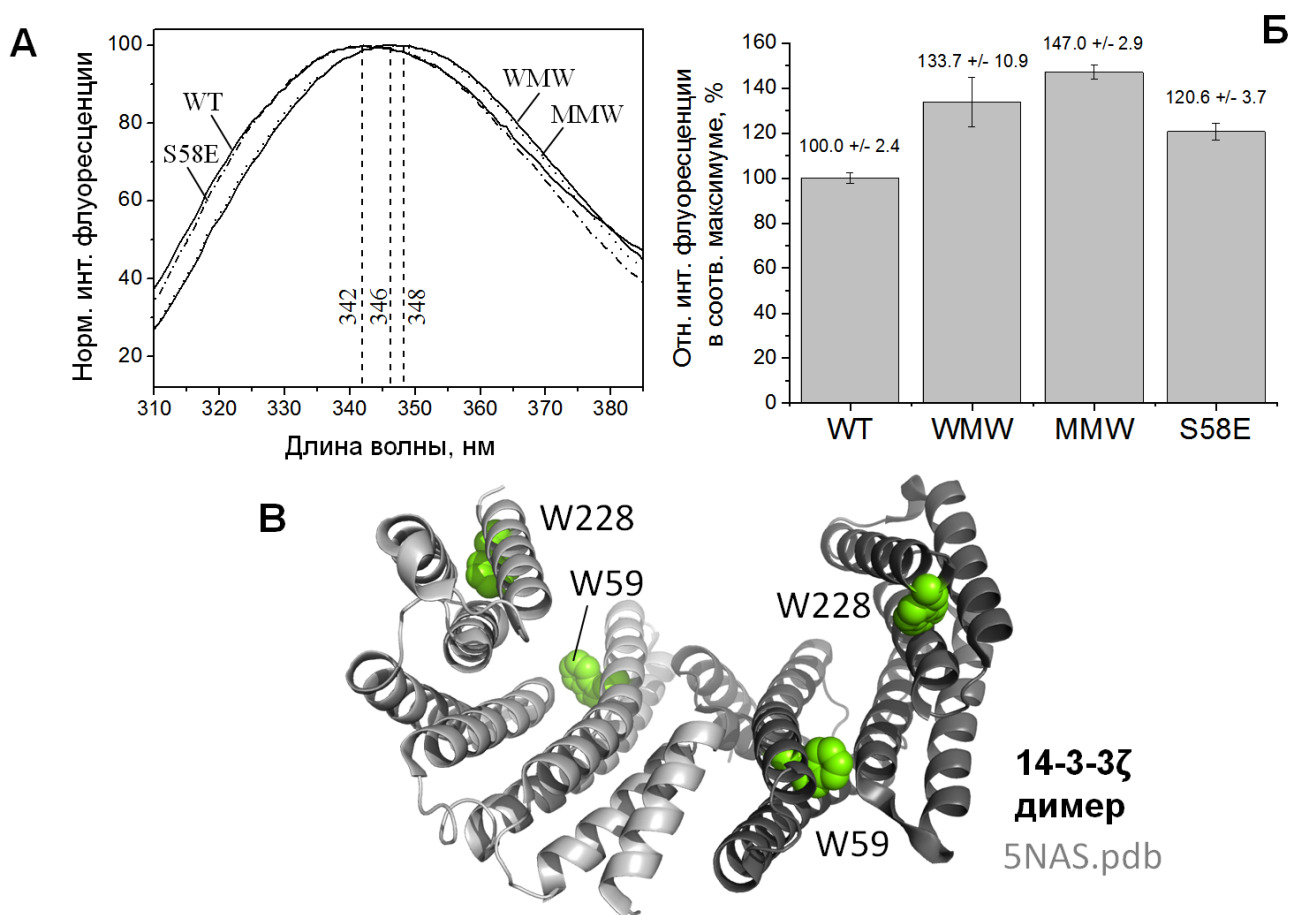


Рис. 93. Сравнение параметров триптофановой флуоресценции 14-3-3ζ дикого типа и его мутантных форм. А. Нормализованные спектры флуоресценции 14-3-3 WT и его вариантов (2 μM) при возбуждении на 295 нм. Длины волн, соответствующие максимумам флуоресценции, обозначены пунктирными линиями. Амплитуды в максимумах для трех независимых измерений были усреднены, нормированы на интенсивность флуоресценции белка дикого типа и показаны на панели Б. Значения относительной интенсивности флуоресценции показаны с ± S.D. В. Модель структуры димера 14-3-3ζ, показывающая расположение остатков триптофана W59 и W228.

Хорошо известно, что гидрофобные контакты важны для стабилизации димера 14-3-3 [71, 72, 113]. Следовательно, мономеризация может привести к экспонированию гидрофобных остатков, расположенных в интерфейсе. Для проверки этого предположения мы провели титрование белков с помощью гидрофобного флуоресцентного зонда бис-АНС.

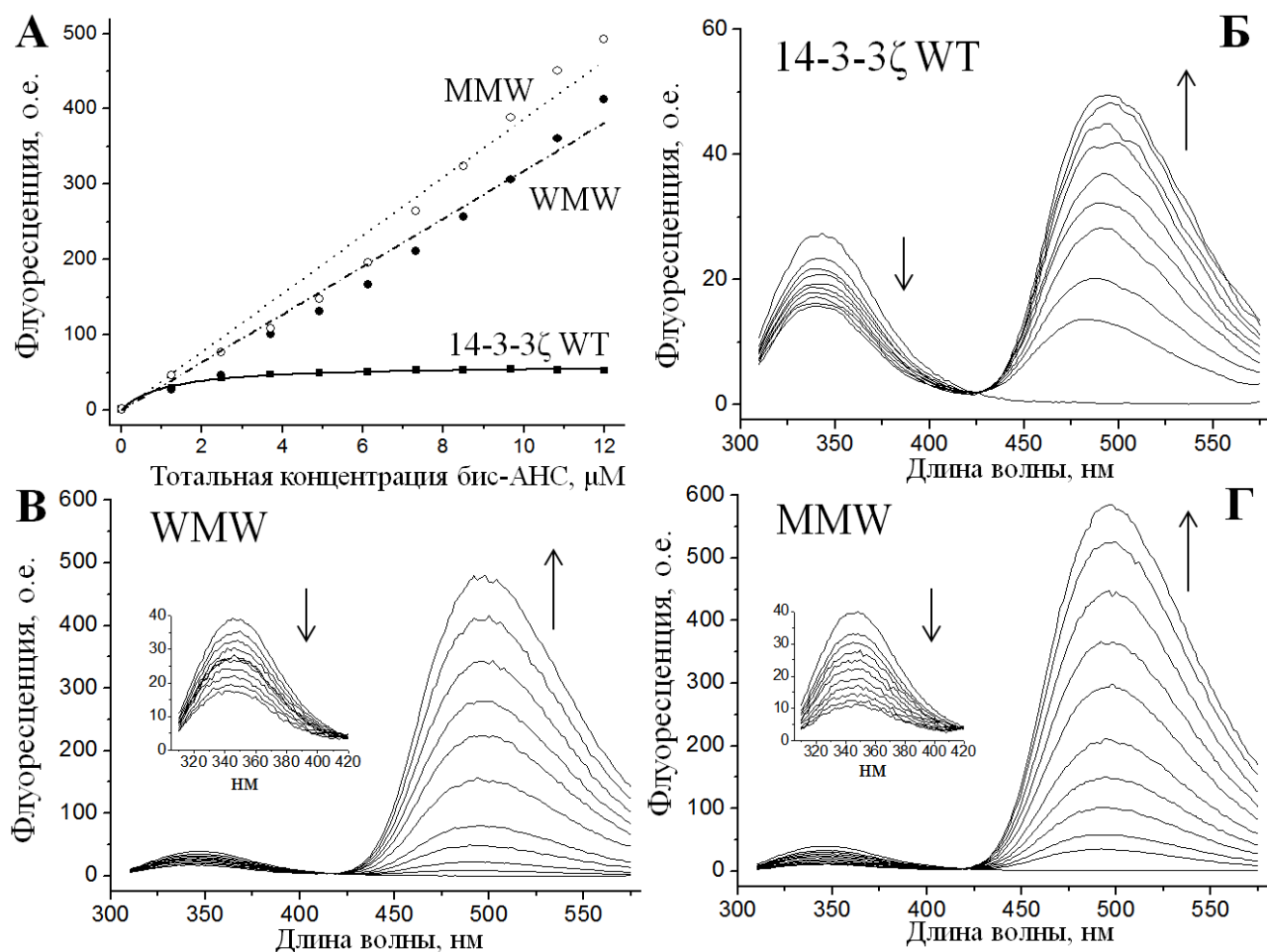


Рис. 94. Связывание бис-АНС с 14-3-3 ζ WT и его вариантами WMW и MMW. А. Титрование 14-3-3 (1 мкМ) увеличивающимися концентрациями бис-АНС (0-12 мкМ), регистрируемое по увеличению интенсивности флуоресценции при 495 нм (возбуждение при 385 нм). Кривые скорректированы на флуоресценцию свободного бис-АНС. Б-Г. FRET с остатков триптофана 14-3-3 ζ на связанный бис-АНС, регистрируемый в ходе титрования, показанного на панели А (возбуждение 295 нм). Вставки показывают крупным планом изменениями спектров флуоресценции белков WMW (В) и MMW (Г) в ходе титрования. Стрелки указывают направление изменений флуоресценции при титровании.

Титрование 14-3-3 ζ WT приводило к умеренному насыщаемому увеличению флуоресценции бис-АНС (Рис. 94А). Это может быть интерпретировано как довольно прочное связывание гидрофобного зонда с небольшим числом сайтов с неярко выраженной гидрофобностью. В идентичных условиях, титрование белков MWW и WMW приводило к практически линейному увеличению флуоресценции бис-АНС, причем амплитуда во всех точках титрования была значительно выше, чем для белка дикого типа (Рис. 94А). Такая картина может отражать связывание бис-АНС с большим числом низкоаффинных гидрофобных сайтов, поскольку в данном случае насыщение (т.е. отклонение от прямой линии) будет достигаться только при очень высокой концентрации бис-АНС, что не может

быть достигнуто экспериментально из-за эффекта реабсорбции флуоресценции при концентрациях бис-АНС выше 15 μM [217]. Эти результаты согласуются с предположением, что мономеризация приводит к экспонированию большого количества гидрофобных сайтов с низким сродством. Титрование приводило не только к увеличению флуоресценции бис-АНС при 495 нм, но также к уменьшению триптофановой флуоресценции 14-3-3 при 340 нм (Рис. 94Б-Г). Этот эффект, по всей видимости, обусловлен Фёрстеровским резонансным переносом энергии (FRET) от возбужденных остатков Trp к молекулам бис-АНС, связанным в окрестности Trp. Титрование мономерных белков WMW и MMW раствором бис-АНС приводило к несколько более выраженному снижению флуоресценции при 340 нм и гораздо более значительному увеличению флуоресценции при 495 нм по сравнению 14-3-3 ζ WT (Рис. 94Б-Г), подтверждая относительно близкое расположение гидрофобных остатков к Trp59 вблизи области димеризации.

Таким образом, мономерные формы 14-3-3 демонстрируют повышенную поверхностную гидрофобность из-за экспонирования остатков, скрытых в зоне димеризации 14-3-3 (например, Met1, Leu12, Ala16, Val61, Val62, Ile65, Tyr82). Повышенная гидрофобность мономера 14-3-3 может быть важной предпосылкой его взаимодействия с белками-мишенями и его потенциальной шапероно-подобной активности.

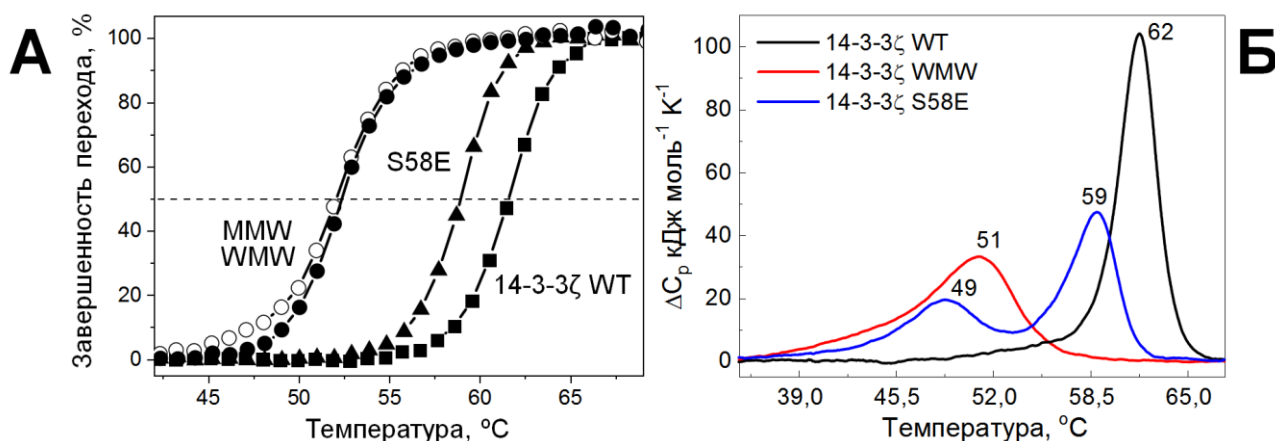


Рис. 95. Термостабильность 14-3-3. А. Температурная зависимость денатурации белков, построенная при измерении их триптофановой флуоресценции при нагревании от 10 до 80 °C с постоянной скоростью 1 °C/мин. Б. Профили ДСК для 14-3-3 ζ WT и его мутантных форм, полученные на дифференциальном сканирующем микрокалориметре DASM-4М при нагревании образцов (0,6 мг/мл) от 5 до 80 °C с постоянной скоростью 1 °C /мин. Значения T_m показаны над пиками в °C.

Поскольку диссоциация димеров может сопровождаться дестабилизацией мономеров, мы проанализировали термостабильность белка дикого типа и его мутантных форм.

Исследуя зависимость собственной флуоресценции от температуры, можно определить температуру полуперехода из нативного в развернутое состояние и оценить таким образом термическую стабильность белка [140, 217, 384]. Используя этот подход, мы обнаружили, что температура полуперехода составила $61,2 \pm 0,4$ °С для 14-3-3 ζ WT, $59,0 \pm 0,2$ °С для псевдофосфорилированного варианта S58E, и была существенно снижена до $53,0 \pm 0,9$ °С и $52,6 \pm 0,7$ °С в случае WMW и MMW, соответственно (Рис. 95А). Эти результаты указывают на то, что замена S58E, имитирующая фосфорилирование, вызывает частичную диссоциацию димера 14-3-3, в то время как замены в белках WMW и MMW индуцируют полную диссоциацию димеров 14-3-3, причем мономеры обладают гораздо более низкой термостабильностью по сравнению с димерами. Такие выводы подтверждались при использовании метода ДСК, согласно которому разница в термостабильности димеров и мономеров составила около 10 °С (Рис. 95Б). Стоит отметить, что кооперативность теплового перехода димерного белка была существенно выше, чем мономерного (Рис. 95Б). При этом, несмотря на меньшую термостабильность, мономерный белок был достаточно стабилен при температурах вплоть до 40 °С, что вполне соответствует физиологическому диапазону.

Белки WMW и MMW образовывали мономеры с похожими свойствами, тем не менее в мутантной форме WMW остаток Glu14 был заменен на Arg, а в MMW – помимо этого, еще и остаток Glu5 был заменен на Lys (см. Рис. 91). Для проверки различий в заряде мы провели изоэлектрическое фокусирование в денатурирующих условиях, которое показало pI для 14-3-3 ζ WT равное 4,55, а для WMW и MMW – равные 4,70 и 4,85, соответственно (Рис. 96). Таким образом, введенные замены изменяют заряд в N-концевой части молекулы. Поскольку при прочих равных мономерный белок WMW содержал наименьшее число замен (3), в дальнейших исследованиях использовали только его (дав ему обозначение «14-3-3 ζ m»).

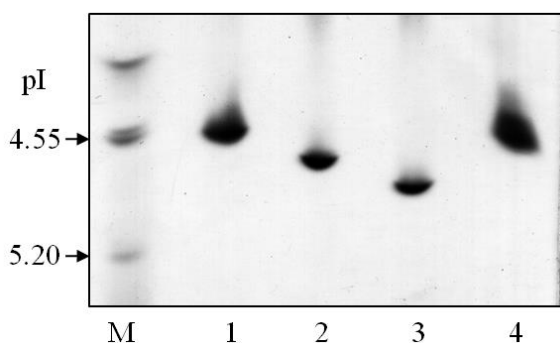


Рис. 96. Изоэлектрическая фокусировка в денатурирующих условиях для 14-3-3 ζ WT (1) и его WMW (2), MMW (3) и S58E (4) мутантных форм. Дорожка «М» соответствует белкам-стандартам с известными значениями pI.

Выявив снижение термостабильности мономеров по сравнению с димерами 14-3-3, мы предположили, что они также будут менее устойчивы к протеолитическому расщеплению. В подобранных условиях 14-3-3 ζ WT был устойчив как к химотрипсинолизу, так и к трипсинолизу в течение 90 мин инкубации (Рис. 97). В идентичных условиях мономерный белок 14-3-3 ζ m эффективно расщеплялся обеими протеазами, и даже короткая (5-10 мин) инкубация приводила к значительному снижению интенсивности 30 кДа полосы интактного белка и быстрому накоплению протеолитических продуктов с массой около 20 кДа (Рис. 97). Паттерны расщепления мономера двумя протеазами заметно отличались, что, по всей видимости, отражает различную специфичность выбранных протеаз к аминокислотным остаткам, расположенным в зоне димеризации 14-3-3 ζ .

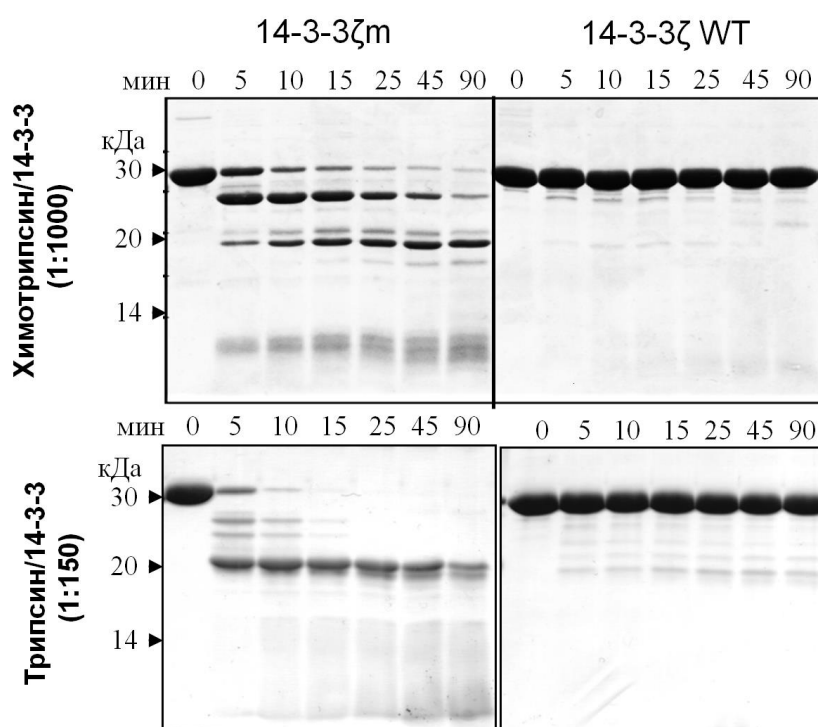


Рис. 97. Устойчивость димера и мономера 14-3-3 ζ к действию трипсина (снизу) и химотрипсина (сверху). Весовые соотношения протеаза/14-3-3 указаны слева, кажущиеся молекулярные массы показаны стрелками (кДа), время отбора (мин) пробы указано над гелями.

Можно предполагать, что фосфорилирование и последующая за ним диссоциация димеров 14-3-3 служит одним из путей деградации белков 14-3-3. В то же время, нельзя исключить, что скрытые в интерфейсе области участвуют в выполнении каких-либо альтернативных функций. Поскольку мономеризация приводит к значительным изменениям свойств 14-3-3, взаимодействие мономеров с белками-партнерами могут также изменяться. В

литературе существуют указания на то, что мутантные формы 14-3-3, не способные к димеризации, способны взаимодействовать с некоторыми белками-партнерами [233, 623, 626]), однако опубликованные результаты были во многом противоречивы. Более того, ни одна из работ не представляла данных, подтверждающих корректность выбранных мономерных мутантных форм. Поэтому мы проанализировали взаимодействие наших мономерных мутантных форм 14-3-3 с двумя модельными белками-партнерами.

3.3.2. Взаимодействие мономерной мутантной формы 14-3-3ζ с фосфорилированными белками-партнерами

Для изучения взаимодействия 14-3-3 с Тау белком, фосфорилированным *in vitro* под действием РКА (рТau), мы использовали химическое «сшивание» глутаровым альдегидом (GA) [167, 248].

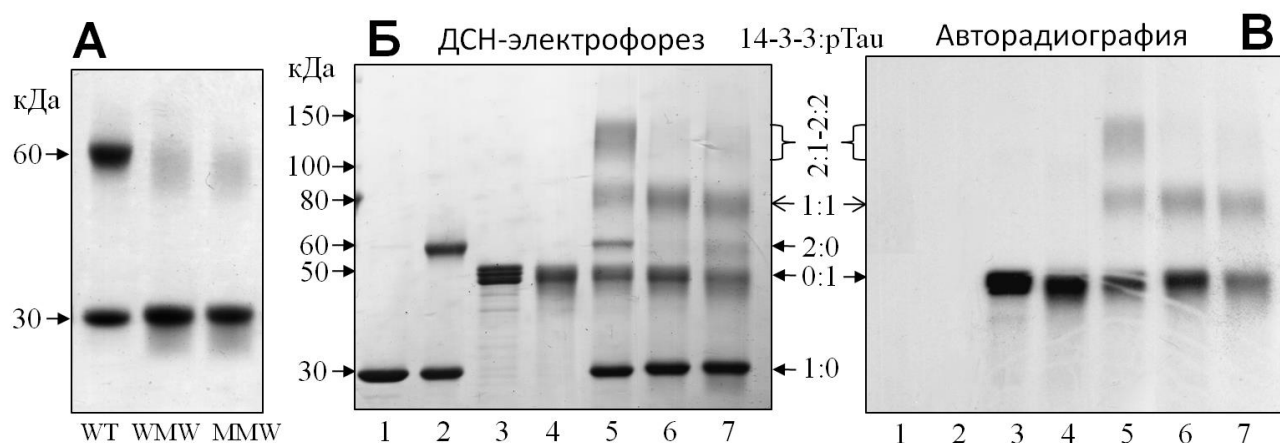


Рис. 98. Химическое сшивание различных видов 14-3-3ζ WT (10 мкМ) с рТau (7 мкМ). А. Сшивание 14-3-3ζ WT и его вариантов WMW и MMW с помощью 0,05% глутаральдегида, проанализированное при ДСН-электрофорезе в 15% геле. Б. Несшитый (1) и сшитый (2) 14-3-3ζ WT, несшитый (3) и сшитый (4) рТau или «сшитые» смеси рТau с 14-3-3ζ WT (5), или его вариантами WMW (6) и MMW (7) подвергали ДСН-электрофорезу в 5-20% градиентном геле. В. Авторадиограмма геля, представленного на панели Б. Положение мономера 14-3-3 (1:0), димера 14-3-3 (2:0), рТau (0:1) и положение маркеров молекулярной массы показаны закрытыми стрелками. Положение комплексов (1:1 и 2:1-2:2) показано открытой и фигурной стрелками, соответственно.

Вначале мы убедились, что в отличие от белка дикого типа, обе мономерных мутантных формы WMW и MMW крайне неэффективно образовывали ковалентно сшитые димеры (Рис. 98А), подтверждая свой мономерный статус и применимость метода сшивания для исследования взаимодействия с рТau. В выбранных условиях обработка GA не приводила к образованию сшитых олигомеров рТau (Рис. 98Б и В, дорожки 3 и 4). Сшивание смеси 14-3-3ζ дикого типа с рТau привело к появлению полос ~80 и ~120-150 кДа, вероятно,

соответствующих комплексам 14-3-3/pTau со стехиометрией 1:1 (80 кДа) и 2:1-2:2 (120 и 150 кДа), соответственно (Рис. 98Б и В, дорожка 5). В случае белков WMW или MMW мы обнаружили образование только одной новой полосы с массой в районе 80 кДа, вероятно, соответствующей комплексу 14-3-3/pTau со стехиометрией 1:1 (Рис. 98Б и В, дорожки 6 и 7). Будучи мономерными, белки WMW и MMW не могли образовывать комплексы со стехиометрией 2:1 или 2:2, которые наблюдались в случае белка дикого типа.

Взаимодействие с pTau с образованием сшитых комплексов в стехиометрии 1:1 позволяло предположить, что мономеры WMW и MMW сохраняют структуру амфипатической бороздки, необходимую для связывания лигандов. Такое предположение подтвердилось данными о том, что присутствие неорганического фосфата значительно увеличивает устойчивость мономерного белка 14-3-3 ζ m к химотрипсинолизу (Рис. 99А).

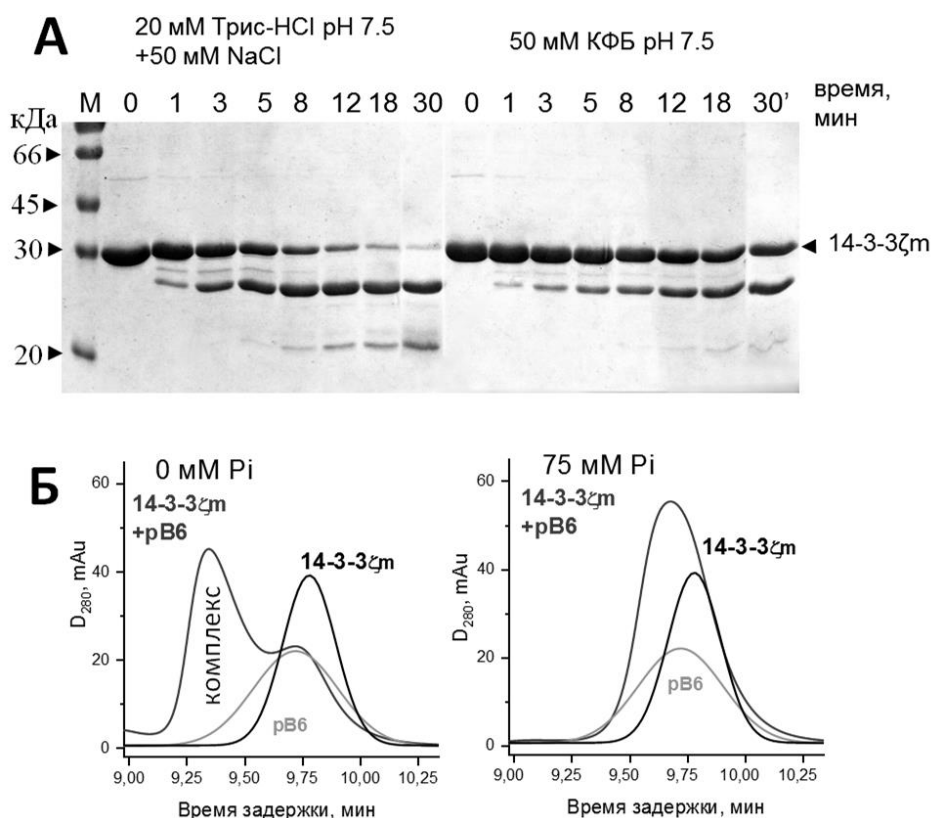


Рис. 99. Эффект фосфата на устойчивость 14-3-3 ζ m к ограниченному химотрипсинолизу (А) и на взаимодействие 14-3-3 ζ m с pV6 (Б). А. 14-3-3 (0,81 мг/мл) в двух буферах, отличающихся наличием или отсутствием фосфата, инкубировали при 37 °С с химотрипсином в весовом соотношении протеаза:субстрат, равном 1:1000, в течение разного времени (указано сверху в мин). Продукты протеолиза анализировали с помощью ДСН-электрофореза в 17% гелях. Стандарты молекулярной массы (в кДа) и положения 14-3-3 мономера указаны стрелками. КФБ – калий-фосфатный буфер. Б. Профили гель-фильтрации с колонки ProSEC300S (Varian), показывающие взаимодействие 14-3-3 ζ m (13 μ M) с pV6 (21 μ M) в отсутствие (слева) или в присутствии (справа) 75 мМ фосфата в буфере для образцов и колоночном буфере. Образование комплекса наблюдалось только в отсутствие фосфата.

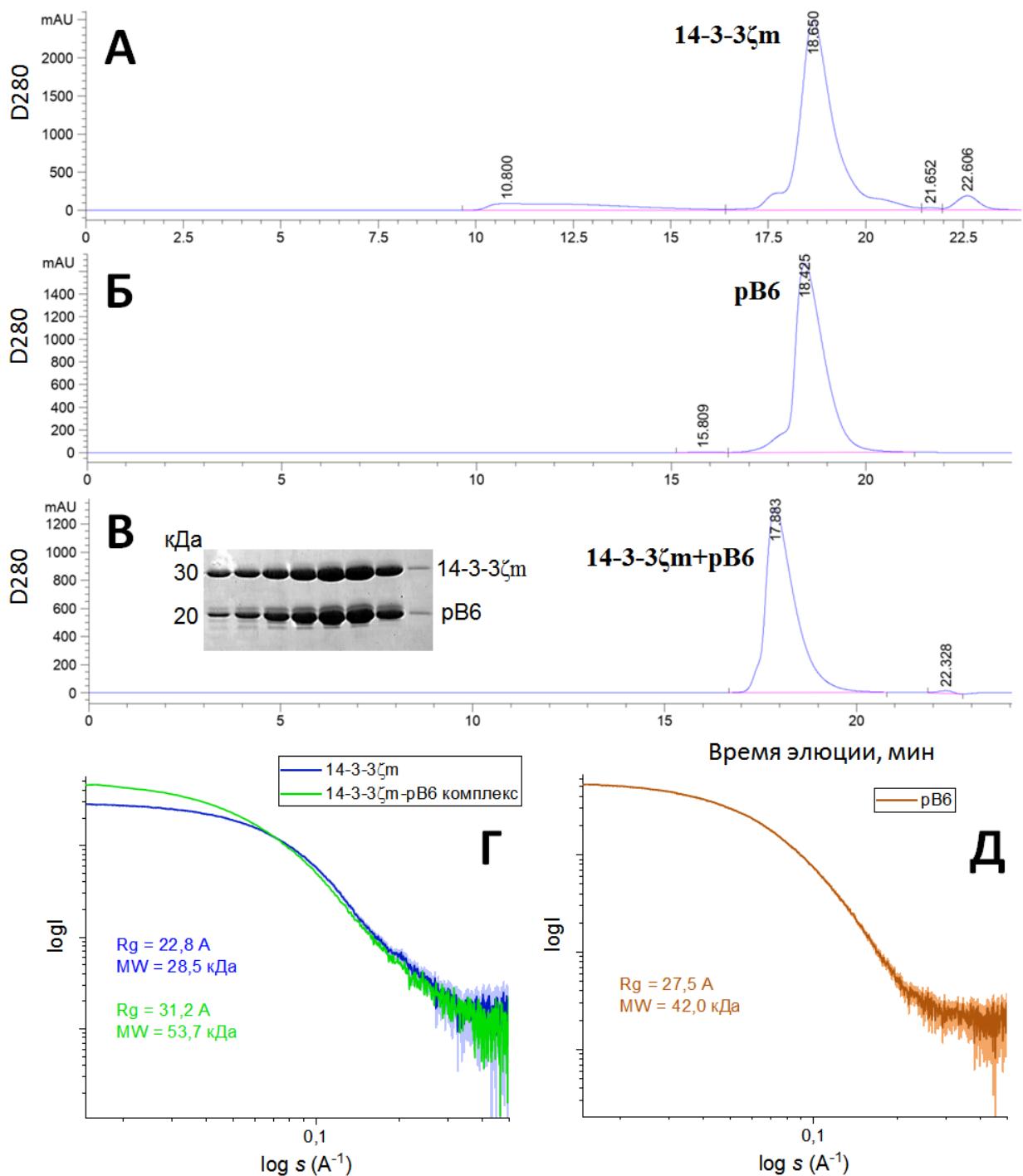


Рис. 100. Анализ 14-3-3ζm, pB6 и их комплекса с помощью гель-фильтрации с детекцией МУРР на синхротроне SOLEIL (Франция). А-В. Образцы (50 мкл) были нанесены на колонку Shodex KW404-4F при скорости потока 200 мкл/мин, при этом элюат анализировали с помощью МУРР, в результате чего для максимума каждого пика были получены усредненные кривые МУРР, скорректированные с учетом рассеяния буфера. На вставке приведен ДСН-гель, показывающий состав фракций пика комплекса белков и их соотношение. Профили МУРР для 14-3-3ζm и его комплекса с pB6 (Г), а также свободного pB6 (Д), на которых приведены экспериментальные значения R_g и M_w , характеризующие размер частиц. Обработка кривых и расчет параметров произведены в программном пакете ATASAS [414].

Далее, с помощью метода гель-фильтрации нам удалось подтвердить способность 14-3-3 ζ m взаимодействовать с фосфорилированным В6 (pВ6) (Рис. 99Б). Более того, добавление 75 мМ фосфата в буфер, содержащий смесь белков, а также колоночный буфер, приводило к практически полному ингибированию взаимодействия 14-3-3 ζ m и pВ6 (Рис. 99Б), аналогично тому, как это происходило в случае с димерными белками 14-3-3 ζ и 14-3-3 γ (Рис. 31). Это подтверждало предположение о том, что, несмотря на сниженную термостабильность и повышенную гидрофобность, мономерная мутантная форма белка 14-3-3 ζ сохраняет структуру амфипатической бороздки и способна связывать фосфорилированные лиганды, которые вытесняются из первичного участка связывания под действием ионов неорганического фосфата.

Мы решили более детально охарактеризовать комплекс 14-3-3 ζ m с pВ6 с помощью нескольких биофизических и спектральных методов. На первом этапе, проводили ГФ свободных 14-3-3 ζ m и pВ6 или их комплекса, регистрируя данные МУРР на синхротроне (Рис. 100). В соответствии с ранее полученными данными Рис. 99Б, профиль каждого из трех образцов содержал единственный основной пик, при этом пик pВ6 элюировался немного раньше, чем пик 14-3-3 ζ m, а в случае смеси белков пик был существенно более сильно сдвинут влево (Рис. 100А-В), указывая на то, что белки образовали комплекс. Это также подтверждалось анализом состава фракций в пике комплекса с помощью ДСН-электрофореза (Рис. 100В, вставка). Данные МУРР для каждого пика были усреднены, и полученные результирующие кривые приведены на Рис. 100Г и Д. Ввиду линейности участка Гинье был проведен анализ гидродинамических параметров частиц в образце 14-3-3 ζ m, pВ6 или их комплекса с помощью пакета программ ATSAAS [414]. Значения массы и радиуса гирации для 14-3-3 ζ m (28,5 кДа, 22,8 Å) и pВ6 (42 кДа, 27,5 Å) хорошо согласовывались с ожидаемыми для мономера 14-3-3 ζ m (расчетная масса 27,5 кДа) и димера pВ6 (расчетная масса 34 кДа), соответственно. Эти данные для 14-3-3 ζ m прекрасно соответствовали результатам, полученным нами с помощью MALLS (Рис. 92Б), однозначно указывая на то, что белок является мономером. Поскольку для идеально сферических частиц $R_g = 0,78 * R_h$, а значение R_h , по данным, представленным на Рис. 92А, для 14-3-3 ζ m составляет около 28 Å, то соотношение R_g/R_h в случае 14-3-3 ζ m составляет $22,8 \text{ Å} / 28,0 \text{ Å} = 0,81$. Из данных, приведенных на Рис. 23 и Рис. 92, этот параметр для димерного 14-3-3 составляет 0,82. Таким образом, мономерный белок 14-3-3 ζ m имеет форму, немного отличающуюся от сферической, и, по-видимому, сплюснут вдоль одной из осей. Определенные нами параметры для белка pВ6 хорошо согласуются с данными работы [313].

Профиль МУРР для комплекса 14-3-3ζm/pB6 сильно отличался, например, от такового для свободного 14-3-3ζm, указывая на частицы большего размера (Рис. 100Г). Анализ гидродинамических параметров непосредственно из данных МУРР с помощью пакета ATSAAS позволил определить массу комплекса равной 53,7 кДа и R_g равным 31,2 Å. Стоит отметить, что полученные данные больше соответствуют стехиометрии 1:1 (28,5 кДа + 21 кДа = 49,5 кДа), поскольку комплекс 1:2 имел бы сильно большую массу (28,5 кДа + 42 кДа = 70,5 кДа). Первичное взаимодействие фосфорилированного сегмента белка pB6 с АБ мономера 14-3-3ζ нам удалось подтвердить (Рис. 98 и Рис. 99). Помимо этого, можно предположить, что, являясь белком-шапероном, B6 АКД также образует вторичные контакты с экспонированной областью димерного интерфейса 14-3-3ζm, содержащего гидрофобные остатки. Из-за наличия слишком большого числа структурно-разупорядоченных частей в таком комплексе и отсутствия дополнительных ограничений, мы воздержались от моделирования его структуры на основании данных МУРР, ограничившись оценкой общих гидродинамических параметров, которые, однако, однозначно подтверждали факт прямого взаимодействия 14-3-3ζm и pB6.

3.3.3. Стабилизация мономерной мутантной формы 14-3-3ζ при взаимодействии с фосфорилированным HSPB6

Далее мы решили исследовать влияние pB6 на стабильность связанного с ним 14-3-3ζm с помощью нескольких методов. Для этого было необходимо подобрать систему, в которой мы могли избирательно отслеживать изменения в термостабильности 14-3-3ζm, не учитывая собственные структурные изменения в pB6.

Выше было показано, что остаток Trp59 определяет собственную флуоресценцию 14-3-3ζ (Рис. 93) [625] и может быть использован для исследования термостабильности 14-3-3 (Рис. 95). Этот остаток триптофана расположен недалеко от АБ 14-3-3ζ, и его флуоресценция может быть успешно использована для исследования взаимодействия 14-3-3 с белком-партнером. Единственный остаток триптофана в pB6 (Trp11) находится в разупорядоченном N-конце недалеко от 14-3-3-связывающего мотива, включающего остаток Ser16 (Рис. 101А). Ввиду расположения в разупорядоченном участке, флуоресценция Trp11 оказалась нечувствительна к структурным изменениям в pB6, вызванным повышением температуры до ~60 °С, и мы не обнаружили тепловой переход pB6, используя этот параметр (Рис. 101Б).

Следовательно, присутствие pB6 в системе не должно было влиять на триптофановую флуоресценцию 14-3-3, по крайней мере при температуре до 60 °С, когда тепловой переход

14-3-3 ζ_m уже практически полностью завершается (Рис. 95). Мы наблюдали за изменениями флуоресценции в 14-3-3 ζ_m в присутствии или в отсутствие рВ6 и определили соответствующие температуры полуперехода. Температура полуперехода 14-3-3 ζ_m была равна $51,1 \pm 0,2$ °С (Рис. 101В), в хорошем соответствии с данными, приведенными на Рис. 95. Добавление рВ6 вызывало повышение температуры полуперехода до $53,3 \pm 0,1$ °С (Рис. 101В), указывая на некоторую стабилизацию 14-3-3 ζ_m при взаимодействии с рВ6.

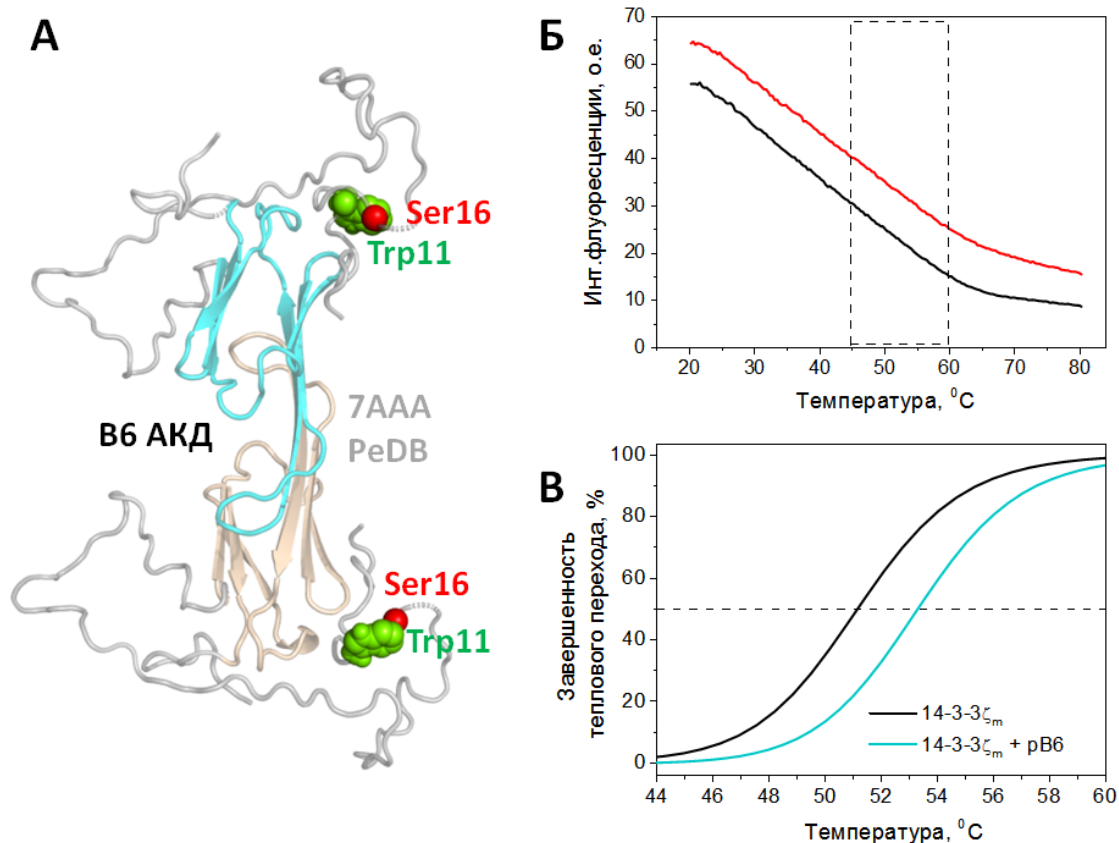


Рис. 101. Эффект связывания рВ6 на тепловой переход 14-3-3 ζ_m , по данным триптофановой флуоресценции. А. Модель структуры полноразмерного димера белка В6 (код 7AAA в Protein Ensemble Database, <http://pedb.vib.be>), показывающая расположение единственного остатка триптофана и фосфорилируемого остатка серина в разупорядоченной области в самом N-конце белка. Б. Белок рВ6 демонстрирует отсутствие теплового перехода по изменению флуоресценции Trp11 вплоть до 60 °С. Пунктиром выделена область, в которой происходит тепловой переход 14-3-3 ζ_m (панель В). Образец рВ6 (7 μ М) нагревали от 20 до 80 °С со скоростью 1 °С/мин, измеряя интенсивность флуоресценции при 320 нм (черная кривая) или 365 нм (красная кривая) при возбуждении при 297 нм. В. Добавление рВ6 к 14-3-3 ζ_m увеличивает температуру его денатурации. Образцы, содержащие 14-3-3 ζ_m (7 μ М) или его комплекс с рВ6 (7 μ М каждого), инкубировали в течение 30 мин и затем нагревали от 20 до 80 °С со скоростью 1 °С/мин, измеряя интенсивность флуоресценции при 320 нм (возбуждение при 297 нм). Для определения температуры полуперехода была использована трансформация зависимости по методу Бушуевой с соавт. [384, 385].

Далее мы воспользовались разницей во вторичной структуре взаимодействующих белков и исследовали термостабильность 14-3-3 ζ m в отсутствие и в присутствии pB6 методом спектроскопии КД в дальнем УФ. В полном соответствии с полученной ранее моделью структуры B6 (Рис. 101А) [313], в составе этого белка доминируют разупорядоченные участки (N- и С-концы) и β -складки (АКД), поэтому он имеет спектр КД низкой амплитуды с минимумом при ~ 208 нм (Рис. 102А). Это согласуется с полученными ранее данными [308]. Фосфорилирование B6 с помощью РКА незначительно уменьшает амплитуду его спектра КД (данные не показаны). В любом случае, амплитуда спектра КД B6 крайне мала по сравнению с таковой у α -спирального 14-3-3 ζ m, который имеет в спектре ярко выраженные минимумы при 208 и 222 нм (Рис. 102Б). Такая амплитуда и форма спектра КД 14-3-3 ζ m указывают на доминирование α -спиральной структуры, аналогично димерному 14-3-3 [131, 217, 627].

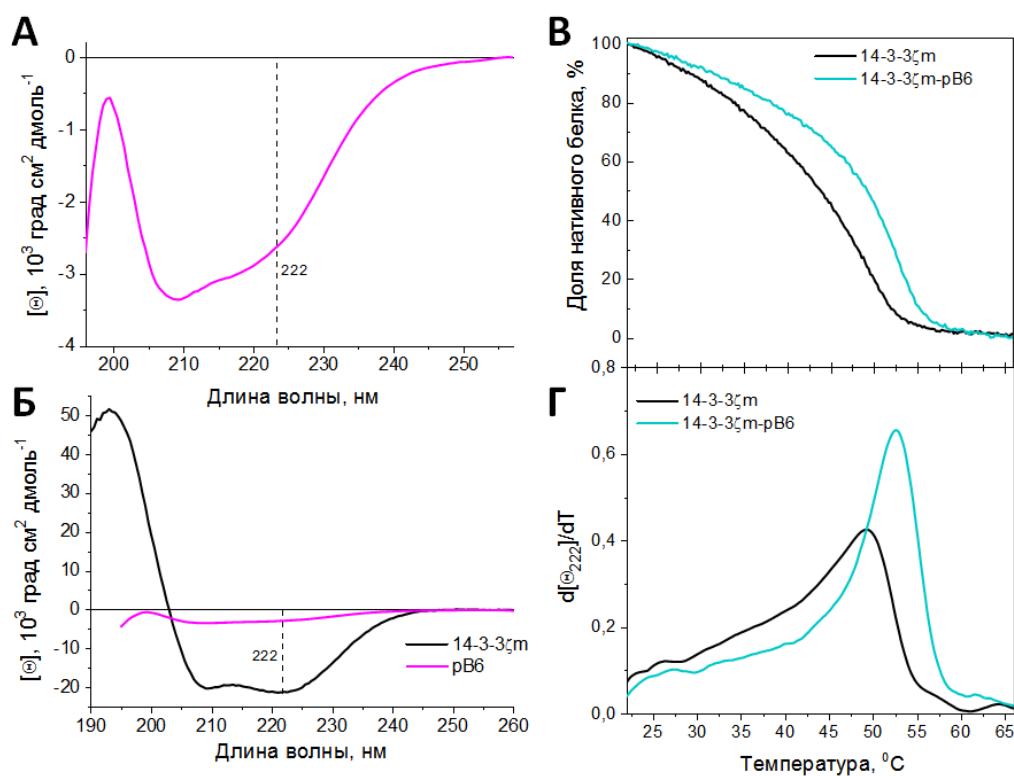


Рис. 102. Исследование термостабильности 14-3-3 ζ m методом КД спектроскопии в дальнем УФ. А. Спектр КД белка pB6 (0,4 мг/мл). Б. Спектр КД белка 14-3-3 ζ m (0,6 мг/мл) в сравнении со спектром КД белка pB6 (0,4 мг/мл). В. Зависимость доли нативного белка для свободного или связанного с pB6 белка 14-3-3 ζ m от температуры. Образцы предварительно инкубировали в течение 30 мин, а затем нагревали от 20 до 70 °С с постоянной скоростью 1 °С/мин, регистрируя значения эллиптичности при 222 нм на дихрографе Chirascan (Applied photophysics). Г. Скорость разворачивания 14-3-3 ζ m, полученная путем дифференцирования кривых, представленных на панели В. Температуры, характеризующие максимальную скорость разворачивания 14-3-3 ζ m с или без pB6, составили $53,0 \pm 0,1$ °С и $49,5 \pm 0,3$ °С, соответственно.

Ввиду сильных спектральных различий двух взаимодействующих белков, измеряя эллиптичность при 222 нм (Θ_{222}), мы смогли проследить температурные изменения α -спиральности 14-3-3 ζ m независимо от присутствия в образце белка pB6. При нагревании доля свернутых 14-3-3 ζ m постепенно уменьшалась, и белок окончательно денатурировал при ~ 60 °C (Рис. 102В и Г). Добавление pB6 вызвало снижение скорости разворачивания 14-3-3 ζ m при температурах ниже ~ 47 °C и увеличение кооперативности перехода при максимальной скорости разворачивания (Рис. 102В и Г). Максимальная скорость разворачивания изолированного 14-3-3 ζ m наблюдалась при $49,5 \pm 0,3$ °C, тогда как в присутствии pB6 максимальная скорость разворачивания 14-3-3 ζ m наблюдалась при $53,0 \pm 0,1$ °C (Рис. 102В и Г). Эти данные были подтверждены с помощью метода ДСК – результаты использования трех описанных методов представлены в Табл. 30. Таким образом, взаимодействие с pB6 несколько повышает термостабильность мономерного 14-3-3 ζ m.

Табл. 30. Эффект связывания pB6 на термостабильность 14-3-3 ζ m.

Образец	Характерные значения температуры денатурации, °C		
	КД спектроскопия	Триптофановая флуоресценция	ДСК
14-3-3 ζ m	$49,5 \pm 0,3$	$51,1 \pm 0,2$	$51,1 \pm 0,1$
14-3-3 ζ m+pB6	$53,0 \pm 0,1$	$53,3 \pm 0,1$	$53,9 \pm 0,1$

3.3.4. Фосфорилирование мономерной мутантной формы 14-3-3 ζ и его эффект на взаимодействие 14-3-3 с белком-партнером

Белки 14-3-3 подвергаются различным способам регуляции, одним из которых является фосфорилирование нескольких остатков под действием целого ряда протеинкиназ [64, 628, 629]. Известно, что при определенных условиях (например, повышенный уровень сфингозина или его производных) фосфорилирование остатка Ser58 приводит к частичной диссоциации димеров 14-3-3 [119, 630, 631]. Фосфорилирование других сайтов, например, остатка Ser63 [628, 632], может еще больше увеличить вероятность диссоциации. При этом из-за расположения в интерфейсе субъединиц фосфорилирование Ser58 затруднено [132, 514]. Было высказано предположение, что 14-3-3, находящиеся в динамическом равновесии димеров с мономерами [114, 216, 217], сдвинутом в сторону димеров, подвергаются фосфорилированию в мономерном состоянии [514]. Однако фосфорилирование мономера

14-3-3 не было описано ввиду отсутствия его подходящей модели. Поэтому мы исследовали фосфорилирование мономерного белка 14-3-3 ζ_m в присутствии РКА, и сравнили его фосфорилирование с таковым у белка дикого типа и у мутантной формы, несущей одновременно мономеризующие $^{12}\text{LAE}^{14} \rightarrow \text{QQR}$ и фосфоимитирующую (S58E) замены (белок « $\zeta_m\text{S58E}$ ») (Рис. 103). Для сравнения эффективности фосфорилирования вариантов 14-3-3, в идентичных условиях был фосфорилирован белок B6.

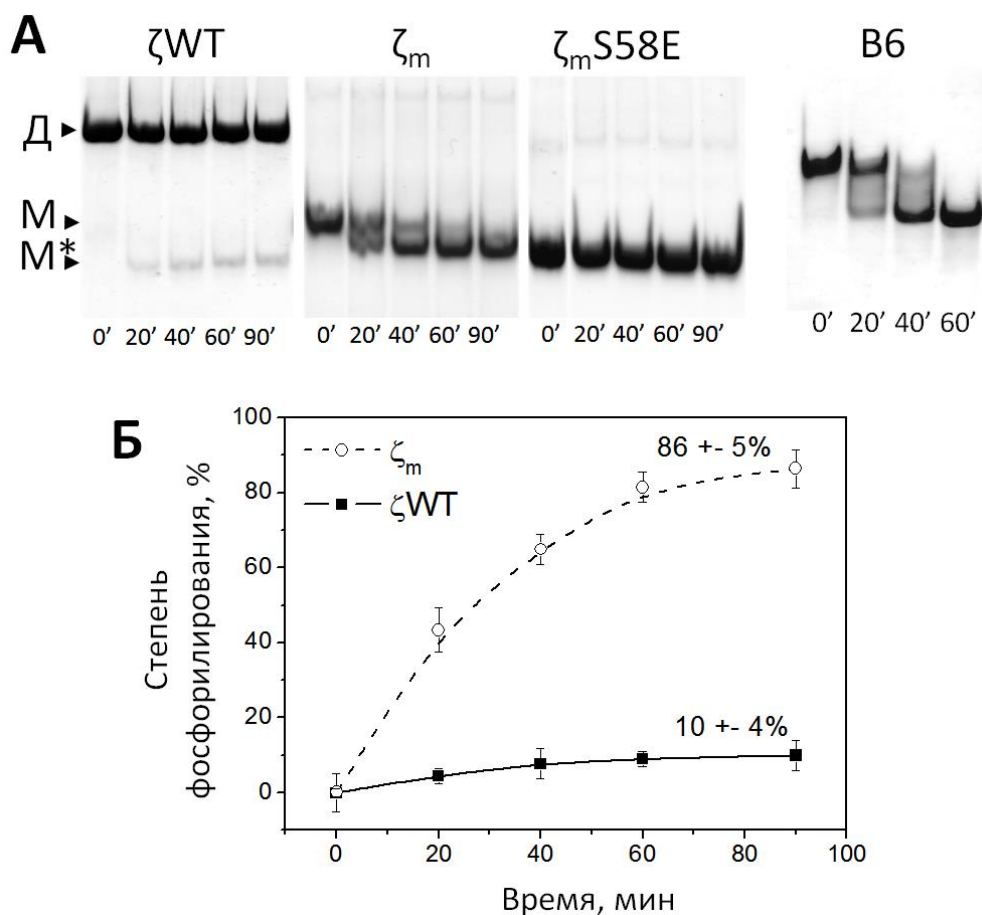


Рис. 103. Фосфорилирование 14-3-3 ζ WT и его вариантов с помощью РКА *in vitro*, по данным нативного гель-электрофореза. А. Электрофореграммы белков, фосфорилированных при 37 °С в течение указанного времени (мин). Позиции 14-3-3 ζ димеров (Д), мономеров (М) и фосфорилированных мономеров (М*) указаны слева. В контроле в идентичных условиях был фосфорилирован белок B6 (самый правый гель). Б. Кинетика фосфорилирования 14-3-3 ζ , по данным количественной денситометрии полосы фосфорилированных мономеров, детектируемых в ходе инкубации с РКА. Ошибки представлены значениями SD в трех независимых экспериментах.

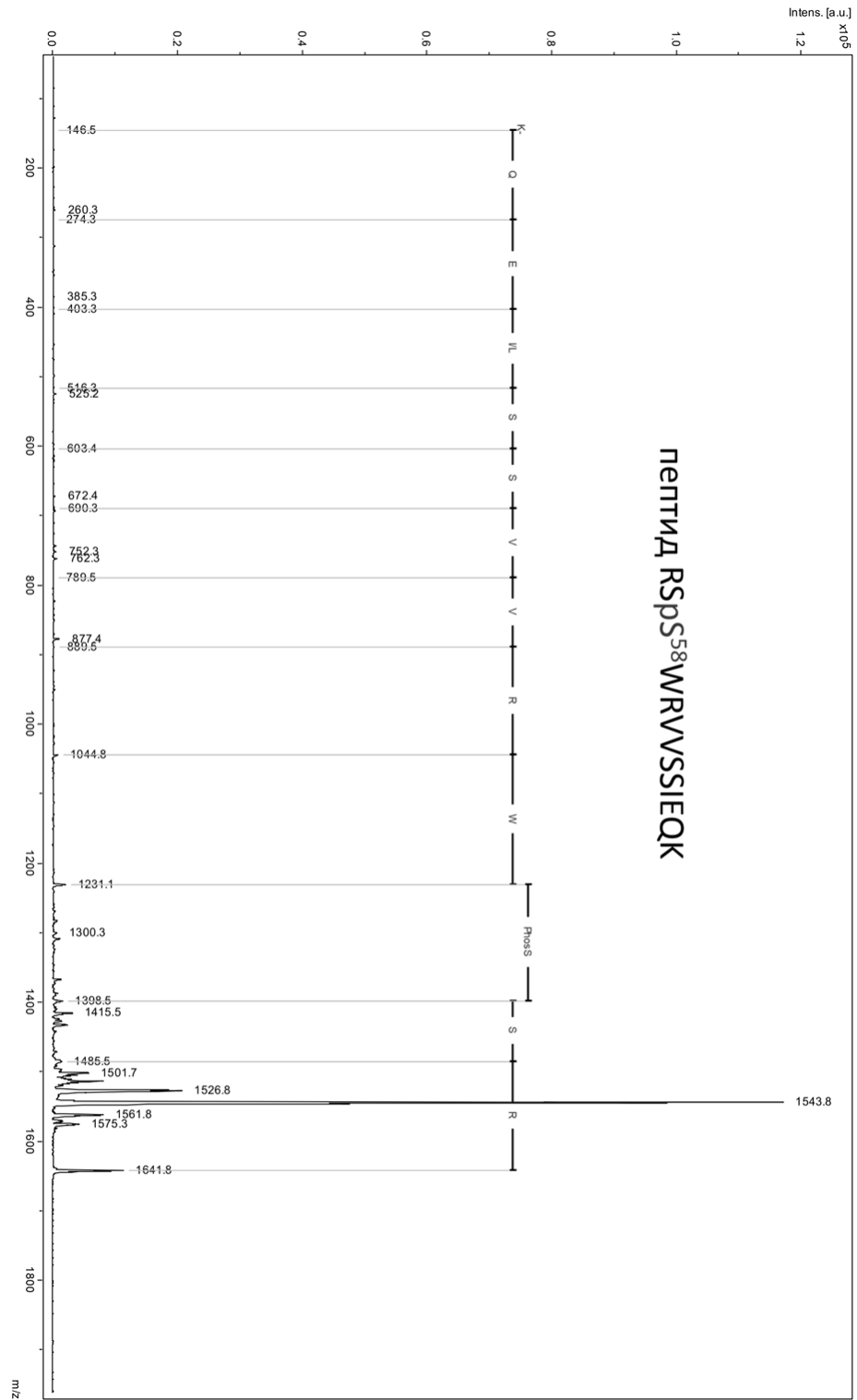


Рис. 104. MS/MS спектр 1641,8 Да пептида, соответствующего фосфорилированию остатка Ser58 в составе 14-3-3ζm.

Как и ожидалось, димерный 14-3-3 ζ WT неэффективно фосфорилировался РКА в условиях, когда мы наблюдали почти стехиометрическое фосфорилирование его мономерной мутантной формы 14-3-3 ζ m (Рис. 103А). Фосфорилирование белка дикого типа (Рис. 103А, левая панель, стрелка «Д») привело к появлению при нативном электрофорезе слабой полосы с высокой электрофоретической подвижностью, наиболее вероятно, соответствующей фосфорилированным мономерам 14-3-3 (Рис. 103А, левая панель, стрелка «М*»), подвижность которой была больше, чем у 14-3-3 ζ m до фосфорилирования (стрелка «М»). Фосфорилирование 14-3-3 ζ m сопровождалось смещением полосы до положения фосфорилированных мономеров WT (Рис. 103А, стрелка «М*»), и к концу инкубации почти весь белок был фосфорилирован с эффективностью, сопоставимой с таковой для В6 в контроле (Рис. 103А, крайний правый гель). Поскольку на геле 14-3-3 ζ m другие белковые полосы не появились, можно было предположить фосфорилирование единственного участка. Чтобы это проверить, полоса предполагаемых фосфорилированных мономеров 14-3-3 («М*») была вырезана и проанализирована с помощью масс-спектрометрии. На масс-спектрах мы смогли найти только один фосфопептид RSSWRVVSSIEQK с массой 1561,7/1641,8 Да (разница 80,1 Да соответствует фосфорилированию), а его спектр МС/МС однозначно подтвердил фосфорилирование Ser58 (Рис. 104). Таким образом, единственным участком фосфорилирования под действием РКА в составе 14-3-3 ζ является Ser58, при этом фосфорилирование происходит эффективно только при диссоциации димеров (Рис. 103Б).

Неудивительно, что мы не смогли наблюдать каких-либо изменений в подвижности мутанта ζ mS58E, чье неизменное положение соответствовало фосфорилированным мономерам 14-3-3 («М*») на протяжении всего эксперимента (Рис. 103А). Следует отметить, что длительная инкубация при фосфорилировании вызвала частичную преципитацию фосфорилированного 14-3-3 ζ m, поэтому для дальнейших структурных исследований был выбран белок ζ mS58E.

Прежде чем перейти к исследованию конформации мономерного 14-3-3 ζ в растворе, мы решили исследовать влияние фосфорилирования 14-3-3 ζ m на взаимодействие с фосфорилированным белком-партнером рВ6. По данным литературы, фосфорилирование остатка Ser58 снижает эффективность взаимодействия с несколькими белками-партнерами [117, 118, 120, 219, 220, 333], включая белок рВ6 [333]. Однако оставалось непонятным, обусловлен ли этот эффект непосредственным влиянием на лиганд-связывающую способность субъединицы 14-3-3, или же опосредован дестабилизирующим влиянием фосфорилирования на димерную конформацию 14-3-3 и диссоциацию. По всей видимости,

проверить это не представлялось возможным, не имея подходящей модели мономерной формы белка 14-3-3 ζ .

Мы сравнили взаимодействие pB6 с 14-3-3 ζ m или 14-3-3 ζ m, стехиометрически фосфорилированным РКА в подобранных условиях (Рис. 103), с помощью гель-фильтрации (Рис. 105А). Как и было показано ранее, pB6 и 14-3-3 ζ m образовывали комплекс, который мог быть отделен на профиле элюции от пиков свободных компонентов, а также содержал оба белка в стехиометрическом соотношении (Рис. 105А). В то же время фосфорилированный препарат 14-3-3 ζ m приводил лишь к небольшим изменениям на профиле элюции, что предполагало образование значительно менее стабильного комплекса (Рис. 105Б). Этот опыт позволил подтвердить предположение о том, что фосфорилирование остатка Ser58 в интерфейсе димеров 14-3-3 может напрямую влиять на взаимодействие с фосфорилированными лигандами. Мы предполагаем, что такой эффект обусловлен расположением этого остатка вблизи остатков, формирующих «карман» для связывания фосфогруппы лигандов (Рис. 105В).

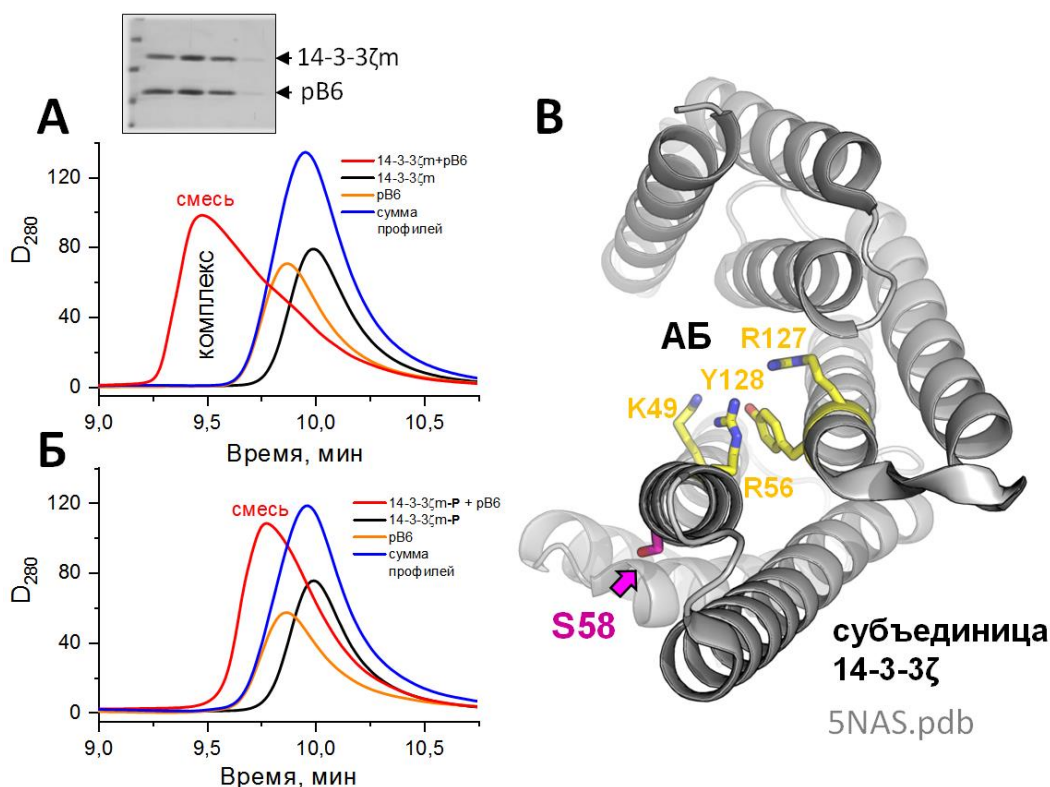


Рис. 105. Фосфорилирование по остатку Ser58 в 14-3-3 ζ m ингибирует его взаимодействие с pB6. А, Б. Профили гель-фильтрации с колонки ProSEC300S (Varian), показывающие эффективное формирование комплекса с pB6 только в случае нефосфорилированного 14-3-3 ζ m. Концентрации 14-3-3 и pB6 равны 35 и 90 μ M, соответственно. Вставка на панели А показывает наличие обоих белков в пике комплекса, по данным ДСН-электрофореза. В. Модель, показывающая пространственно близкое расположение остатка Ser58 к остаткам положительно заряженного «кармана» амфипатической бороздки 14-3-3 ζ (АБ), в котором происходит связывание фосфорилированных лигандов.

3.3.5. Склонность к разупорядоченности структуры, скрытая в N-конце белков 14-3-3

Учитывая, что диссоциация димеров 14-3-3 должна быть связана с нарушением большого числа контактов, включая взаимодействие $\alpha 1$ и $\alpha 2$ спиралей, мы предположили, что конформация свободной мономерной формы отличается от конформации субъединицы в димере 14-3-3. Судя по всему, N-концевой сегмент 14-3-3 обладает принципиальной способностью принимать различные конформации. Несмотря на то, что эта область ($\alpha 1$ и $\alpha 2$ спирали) практически во всех известных структурах димеров 14-3-3 вовлечена в образование межмолекулярных контактов, мы обнаружили, что это не так в кристаллической структуре 14-3-3 из *Cryptosporidium parvum* (код PDB 3EFZ; код UniProt Q5CSF3). В этой структуре один из мономеров имеет соответствующий N-концевой сегмент в форме удлиненной α -спирали, тогда как во втором мономере димера большая часть этого сегмента отсутствует на карте электронной плотности из-за структурной разупорядоченности (ID) (Рис. 106). Это указывает на то, что N-концевой сегмент 14-3-3 может переключаться между по меньшей мере тремя структурно различными состояниями (две короткие α -спирали \leftrightarrow одна длинная α -спираль \leftrightarrow ID) и, следовательно, обладает полиморфизмом и особенностями так называемой *условной* структурной разупорядоченности [633, 634]. Предпосылки такого поведения должны лежать в аминокислотной последовательности, что требовало тщательного анализа.

Широко известно, что аминокислотные последовательности белков IDP и структурированных белков/доменов сильно отличаются, что делает возможным предсказание склонности той или иной области белка к ID по его аминокислотной последовательности [15, 17, 31, 160, 430, 431, 635-642]. Склонность 14-3-3 белков к ID оценивали с помощью ряда вычислительных инструментов. На Рис. 107 и в *Дополнении 1* представлены результаты этого анализа для всех изоформ 14-3-3 человека и их гомологов из разных организмов. Мы обнаружили, что все представители 14-3-3 характеризуются удивительной консервативностью в склонности N-концевой области белка к ID. Здесь представлены в основном результаты вычислительного анализа с помощью алгоритма *PONDR® VSL2B* [432], однако качественно сходные результаты были получены с помощью *PONDR® VLXT* [160], *PONDR® VL3* [433], *PONDR FIT* [434], *IUPred* [435] и *RONN* [436], каждый из которых подтвердил, что N-концевые сегменты (первые ~85 остатков) и C-концевые хвосты (последние ~15 остатков) всех 14-3-3 человека имеют выраженную склонность к структурной разупорядоченности. Данные, приведенные в *Дополнении 1*, также

указывают на то, что особенности распределения ID для ортологов 14-3-3ζ эволюционно сохранены даже у филогенетически довольно сильно отдаленных видов организмов.

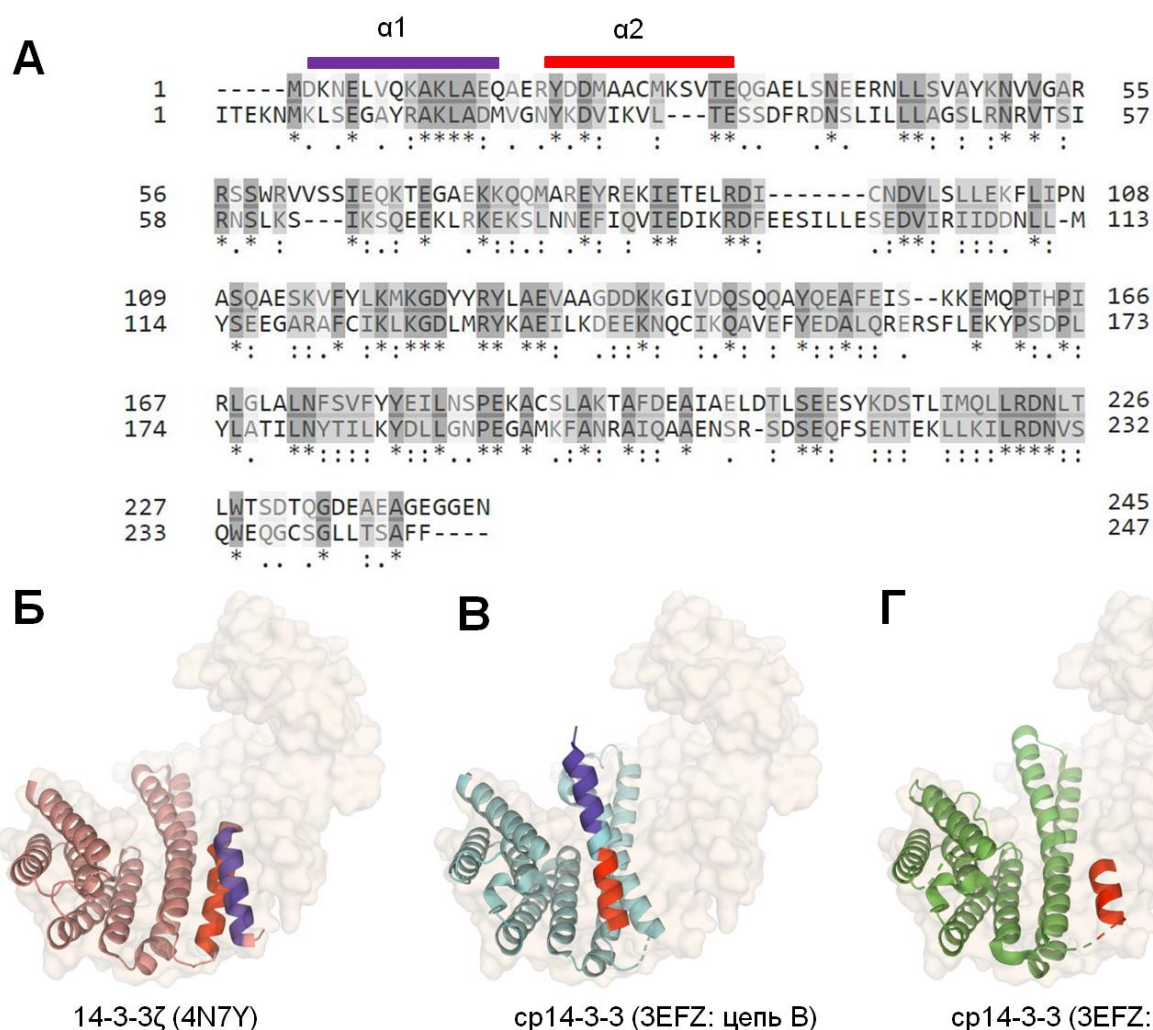


Рис. 106. Структурный полиморфизм N-концевого сегмента 14-3-3. А. Выравнивание последовательностей 14-3-3ζ человека (UniProt P63104) и *Cryptosporidium parvum* (cp14-3-3, UniProt Q5CSF3), позволяющее картировать α1 и α2 спирали в структуре cp14-3-3. Б-Г. Наложение кристаллических структур димера 14-3-3ζ человека (полупрозрачная поверхность) с двумя цепями cp14-3-3 (показаны голубыми и зелеными спиралями на панелях В и Г, соответственно, в сравнении со структурой субъединицы 14-3-3ζ человека (Б)). N-концевые спирали α1 (фиолетовый) и α2 (красный) соответствуют областям, идентифицированным по выравниванию на панели А. N-концевой сегмент принимает различные конформации и состоит из двух коротких α-спиралей, одной длинной или частично разупорядочен.

В N-конце различных 14-3-3 склонность к ID у первых ~40 остатков наиболее выражена. Этот вывод подтверждается общими высокими показателями ID остатков в этой области (Рис. 107) и проиллюстрирован на Рис. 108, который представляет результаты анализа трех N-концевых сегментов разной длины для изоформ 14-3-3 из разных организмов с использованием параметрического СН графика заряда-гидрофобности [15, 437].

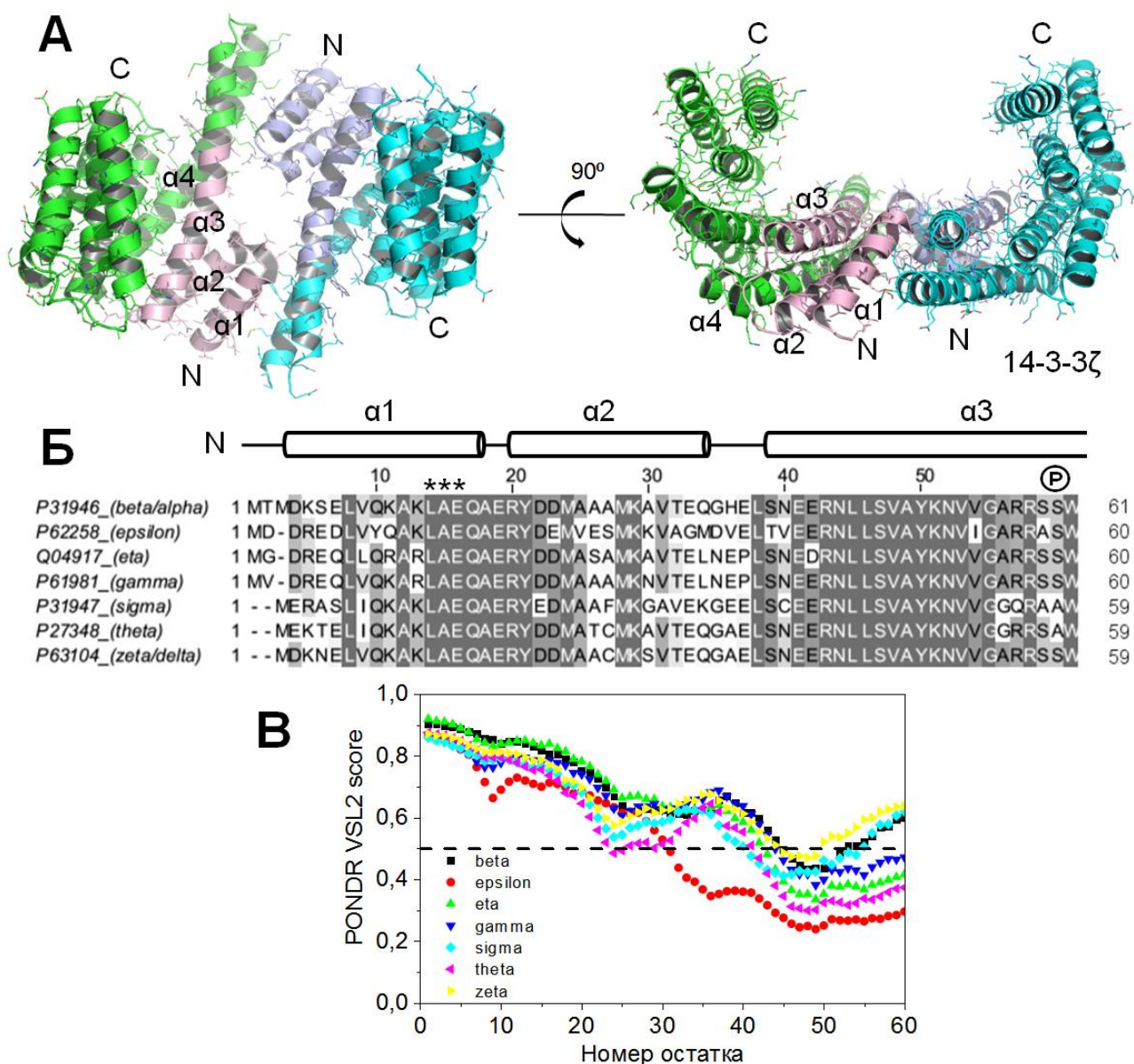


Рис. 107. Особенности области димеризации белков 14-3-3. А. Модель структуры димера 14-3-3 ζ (код PDB 4N7Y) в двух проекциях, показывающих область димеризации в N-концевой области (остатки 1-60 выделены другим цветом). Первые α -спирали ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) на одном мономере обозначены. Б. Множественное выравнивание с помощью *T-Coffee* [441] последовательности первых ~60 остатков семи изоформ человека 14-3-3 (область, выделенная на панели А; соответствующие $\alpha 1$ - $\alpha 3$ спирали показаны в виде цилиндров над выравниванием). Сходство выше 50% было использовано для затенения консервативных остатков с использованием оттенков серого. Консервативный кластер остатков LAE в $\alpha 1$ обозначен ***, а полуконсервативный фосфорилируемый остаток Ser58 (ζ нумерация) отмечен значком Ⓟ. В. Оценка склонности к разупорядоченности для 1-60 остатков каждой изоформы 14-3-3 человека, рассчитанная с использованием алгоритма *POND R VSL2* [432] с использованием полных последовательностей белка в качестве входных данных.

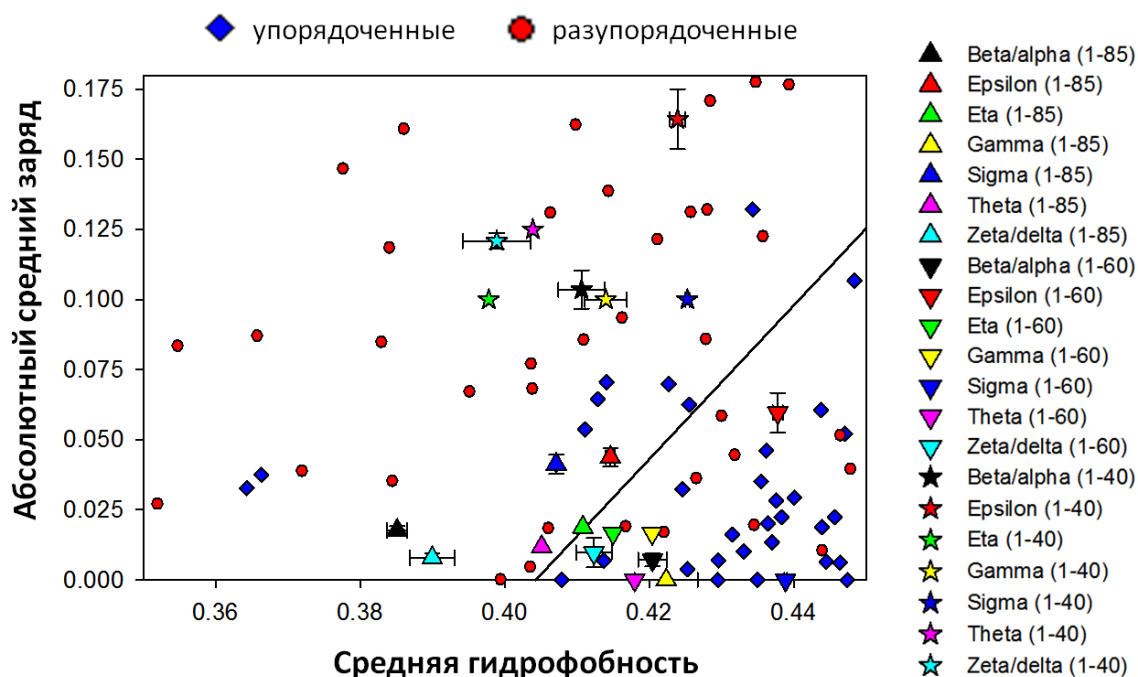


Рис. 108. Анализ склонности N-концевых сегментов изоформ 14-3-3 из различных организмов к ID с помощью параметрического графика заряд-гидрофобность (charge-hydrophathy). Последовательности, соответствующие первым 40 (1-40), первым 60 (1-60) или первым 85 (1-85) остаткам 14-3-3, были проанализированы с точки зрения наличия аминокислотных остатков, имеющих заряд или гидрофобную природу. Для каждой изоформы были взяты средние значения заряда и гидрофобности по выборке ортологов этой изоформы из разных организмов. В результате каждая последовательность нанесена на график в виде точки. Белки с известной структурой (упорядоченные) или ее отсутствием (разупорядоченные) образуют на таком графике четкие кластеры, которые могут быть условно отделены друг от друга эмпирически установленной границей (сплошная диагональная линия). Попадание исследуемой последовательности-точки в ту или иную область указывает на степень предрасположенности ее к ID. Сегменты 1-40 для всех 14-3-3 человека попадают в зону, характеризующую склонность к ID.

На СН-графиках используется наблюдение о том, что из-за существенной разницы в среднем суммарном заряде и средней гидрофобности упорядоченные и разупорядоченные белки занимают две отчетливых области в фазовом пространстве заряд-гидрофобность, где они могут быть разделены линейной границей [15, 437]. Из-за того, что почти все точки, соответствующие N-концевым областям белков 14-3-3 (остатки 1-85 или 1-40, показанные треугольниками и звездами, соответственно), расположены над границей (Рис. 108), N-концевые сегменты всех изоформ 14-3-3 в отсутствие стабилизирующих факторов, предположительно, будут вести себя как структурно разупорядоченные области. Такой анализ указывает на особо выраженную склонность к ID у первых 40 остатков всех изоформ 14-3-3, поскольку соответствующие точки находятся очень далеко от границы.

Как было отмечено выше, в большинстве кристаллических структур 14-3-3 предсказанная разупорядоченная N-концевая область складывается в первые четыре α -спирали, непосредственно участвующие в образовании димера 14-3-3 (Рис. 106). Фактически, в 14-3-3 ζ область димеризации формируется взаимодействием спирали $\alpha 1$ (остатки 2–16) одного мономера со спиралью $\alpha 3$ (остатки 38–66) и $\alpha 4$ (остатки 73–103) другого мономера, и наоборот (Рис. 107). В подтверждение этому, было показано, что делеции в N-концевой области полностью подавляют димеризацию 14-3-3 [233, 626, 643].

Мы попытались проанализировать причину высокоэффективной мономерирующей способности аминокислотных замен, использованных нами для получения мономерной формы 14-3-3 ζ . Остатки $^{12}\text{LAE}^{14}$ абсолютно консервативны среди всех 14-3-3, охарактеризованных на сегодняшний день, и только изоформа 14-3-3 β из *Xenopus* содержит S вместо A. Это может означать, что кластер мутаций $^{12}\text{QQR}^{14}$, использованных нами для мономеризации 14-3-3 ζ (Рис. 91), должен работать с практически любой изоформой 14-3-3. На Рис. 109А и Б показано, что замена $^{12}\text{LAE}^{14} \rightarrow ^{12}\text{QQR}^{14}$ дополнительно увеличивает вероятность структурной разупорядоченности в области первых 40 остатков последовательности. Можно предположить, что аминокислотный состав N-концевого сегмента 14-3-3 эволюционно подобран таким образом, чтобы обеспечить структурный полиморфизм, который необходим для гомо- и гетеродимеризации 14-3-3 и, возможно, для функционирования этих белков. В то же время слишком сильная разупорядоченность в этой области препятствует образованию нормального димерного интерфейса, приводя к мономеризации белка (Рис. 109В).

Таким образом, независимо от организма и изоформы, все 14-3-3 очень похожи по своей склонности к ID, и можно ожидать, что все они имеют довольно неупорядоченные N- и C-концы. Хотя разупорядоченная природа C-концевых сегментов экспериментально подтверждена [131], разупорядоченность в N-концевых сегментах, взаимно стабилизированных в димере 14-3-3, значительно менее очевидна и не была подтверждена экспериментально. Вероятно, лучшим способом выявить конформационные изменения в N-концевом сегменте 14-3-3 было исследование структуры мономерной формы белка, 14-3-3 ζ m. Поскольку основным способом получения мономеров 14-3-3 в клетке является фосфорилирование Ser58 [118, 119, 209, 211], мы использовали наиболее стабильный мономерный препарат 14-3-3 – ζ mS58E.

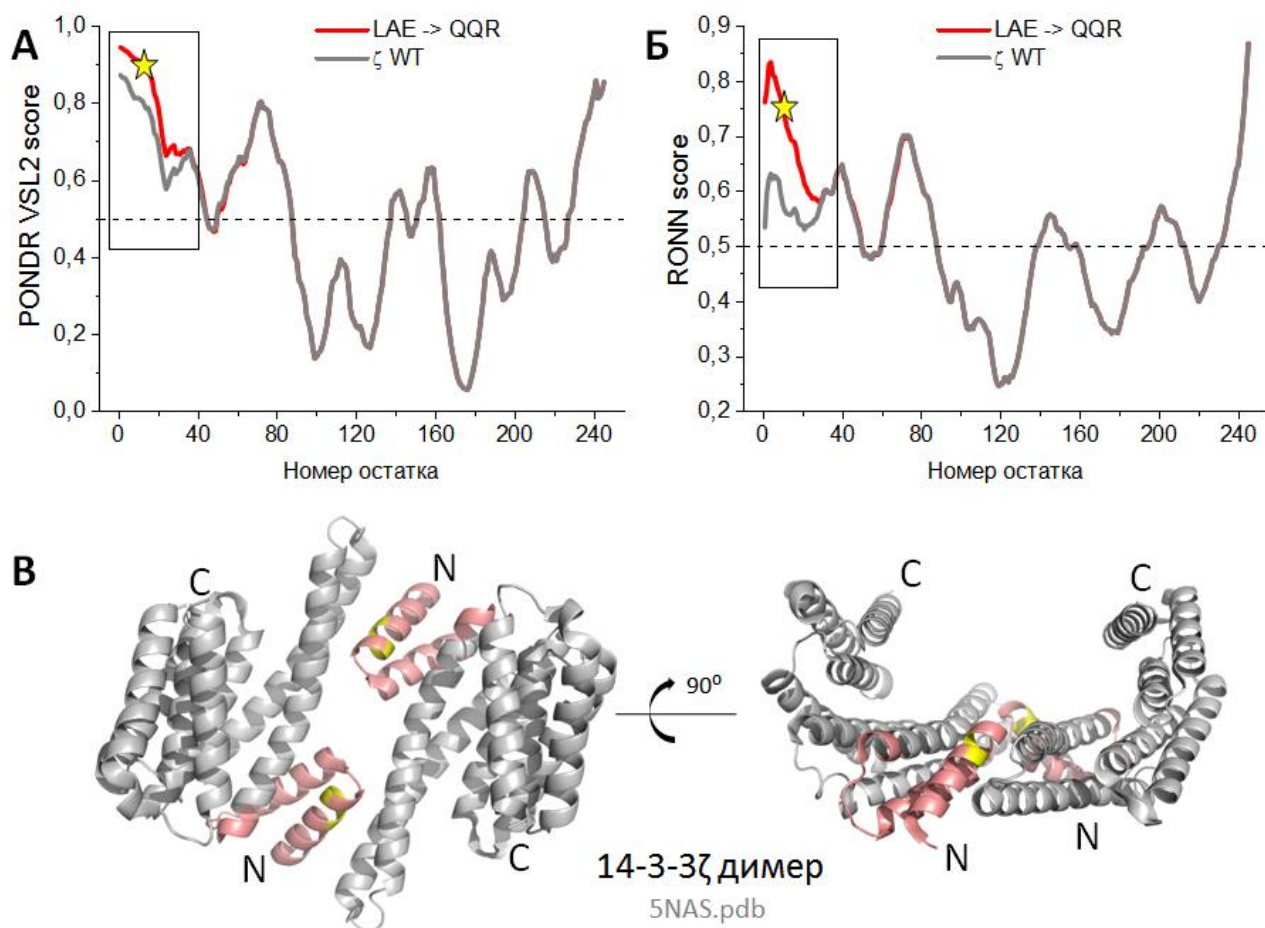


Рис. 109. Эффект замен $^{12}\text{LAE}^{14} \rightarrow \text{QQR}$ в первой α -спирали 14-3-3 ζ на склонность его N-концевой области к структурной разупорядоченности. Предсказание склонности к разупорядоченности для белка дикого типа (серые линии) и его мутантной последовательности (красные линии), выполненное с помощью алгоритмов *PONDR* [432] (А) и *RONN* [436] (Б). Желтой звездочкой показано расположение мутированных остатков 12-14. Пороговое значение равно 0,5, выше которого сегмент считается разупорядоченным, наибольший эффект наблюдался в области, отмеченной прямоугольником. В. Структура димера 14-3-3 ζ в двух ортогональных проекциях, на которой отмечено расположение N-концевого сегмента 1-40 с повышенной склонностью к разупорядоченности (красный) и кластера $^{12}\text{LAE}^{14}$ (желтый).

3.3.6. Структурная конформация мономерной формы 14-3-3 ζ в растворе

Поскольку α -спирали и разупорядоченные структуры дают принципиально разный вклад в спектр КД в дальнем УФ, этот метод представлялся крайне информативным для сравнения димерного белка дикого типа и его мутантной формы ζmS58E . Мы сравнили их спектры КД при 25 °С со спектром мутантной формы S58E, чья олигомерная структура зависит от концентрации белка (Рис. 92). Предварительно образцы белка были тщательно отдиализованы и отфильтрованы, а затем исследованы в разных концентрациях (Рис. 110).

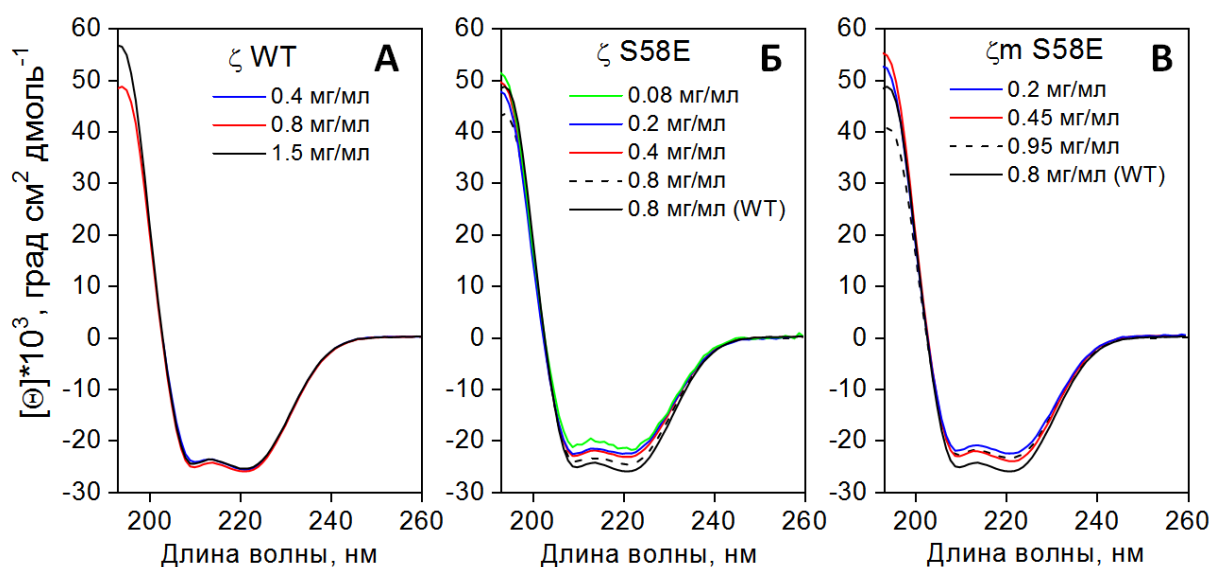


Рис. 110. Спектры КД в дальнем УФ для 14-3-3 ζ и его мутантных форм при 25 °С. Представлены серии концентраций для белка WT (А), его псевдофосфорилированного варианта S58E (Б) или псевдофосфорилированного мономерного варианта ζ mS58E (В). Спектры были скорректированы на концентрацию белка при расчете молярной эллиптичности на остаток.

Спектры КД белка дикого типа имеют два минимума при 208 и 222 нм, характерные для α -спиральных белков, и остаются неизменными при разбавлении белка диализным буфером (Рис. 110А). Значение молярной эллиптичности при 222 нм было равно $\sim 26\ 000$ град см^2 дмоль^{-1} , что хорошо согласуется с ранее опубликованными данными и кристаллической структурой 14-3-3 [112, 217]. В случае мутантной формы S58E мы наблюдали небольшое, но заметное уменьшение амплитуды спектра при разбавлении (Рис. 110Б). Важно отметить, что мы проанализировали концентрации в диапазоне, где этот белок демонстрирует значительную концентрационно-зависимую диссоциацию (Рис. 92). В этом диапазоне мы наблюдали уменьшение значений эллиптичности при 222 нм на ~ 12 -16% (Рис. 110Б), что указывало на небольшое уменьшение α -спиральности белка, зависящее от его концентрации. В подтверждение этого, мы наблюдали уменьшенную на $\sim 15\%$ амплитуду спектров мутантной формы ζ mS58E, которая в этом диапазоне концентраций белка остается мономерной (Рис. 110В и Рис. 92). Это указывало на то, что мономерный 14-3-3 содержит на $\sim 16\%$ меньше α -спиральных структур, чем димерный 14-3-3. С учетом наличия 245 остатков в 14-3-3 ζ , это превращается в разницу в ~ 40 остатков.

Несмотря на различия в амплитуде при 25 °С (Рис. 110), мы наблюдали практически неразличимые спектры КД для белка 14-3-3 ζ WT и его варианта ζ mS58E, предварительно инкубированных в течение нескольких часов при 5 °С (Рис. 111А). Таким образом, мы

предположили, что вторичная структура 14-3-3 достаточно лабильна и может изменяться с температурой даже ниже температуры теплового перехода.

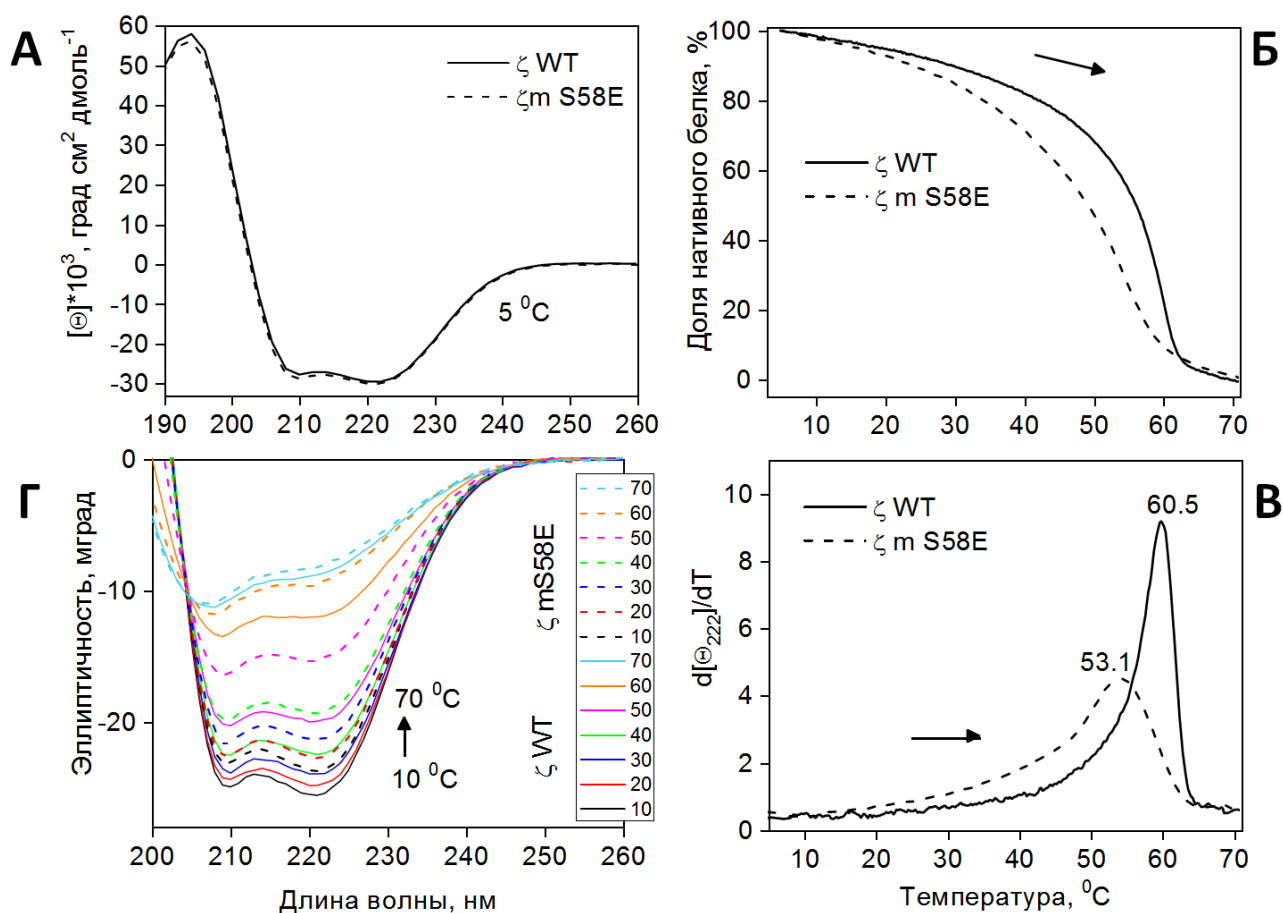


Рис. 111. Температурная зависимость α -спиральности 14-3-3 ζ WT и ее мономерного варианта 14-3-3 ζ m-S58E. А. КД спектры белков, предварительно инкубированных при 5 °C в течение нескольких часов. Б. Температурная зависимость эллиптичности белков при 222 нм при нагревании от 5 до 75 °C с постоянной скоростью 1 °C/мин. В. Первая производная от кривых, представленных на панели Б, показывающая температуры теплового перехода. Г. Спектральные изменения в ходе нагревания белков с одинаковой скоростью. Для наглядности представлены только температуры от 10 до 70 °C, с шагом 10 °C. Стрелки указывают направление изменения температуры. При каждой температуре вплоть до 60 °C амплитуда минимума спектров мономерного мутанта ниже по сравнению с белком дикого типа.

Мы проанализировали температурные зависимости α -спиральности белка путем измерения эллиптичности при 222 нм или полных спектров КД при нагревании димерного белка 14-3-3 ζ или его варианта ζ mS58E от 5 до 75 °C (Рис. 111). Повышение температуры вызывало постепенное уменьшение сигнала от спиральных структур для обоих белков, в то время как во всем диапазоне температур до ~60 °C мутантная форма ζ mS58E оставалась менее α -спиральной, чем димерный белок дикого типа (Рис. 111Б). Дифференцирование

зависимости доли нативного белка от температуры для каждого белка дала пики, отражающие их тепловой переход (Рис. 111В). Такой подход позволил определить кажущуюся температуру денатурации белка WT (~60,5 °С) и его варианта ζmS58E (~53,1 °С), что хорошо согласуется с полученными ранее данными с использованием других методов (Рис. 95). Тепловой переход мономерного белка происходит в диапазоне ~45-62 °С. В то же время, еще до его начала белок ζmS58E демонстрировал заметно менее выраженную α-спиральность (эллиптичность при 222 нм), которая зависела от температуры (Рис. 111Б). Это еще более отчетливо видно на Рис. 111Г, который показывает изменения спектров КД для обоих белков при нагревании, с шагом в 10 °С. Важно отметить, что для обоих белков уменьшение сигнала при 208/222 нм сопровождалось увеличением сигнала при ~200 нм, где вклад неупорядоченных структур является наиболее существенным, с изобестической точкой в районе 205 нм, указывая на переход от α-спиральных к разупорядоченным структурам (Рис. 111Г). Парное сравнение спектров белка WT и ζmS58E при одинаковой температуре в физиологическом диапазоне (20 °С ≤ T ≤ 40 °С) показывает, что белок ζmS58E имеет на ~10-15% менее выраженную α-спиральность по сравнению с димерным белком. Это различие эквивалентно разнице в ~30-40 остатков, которые участвуют в конформационной перестройке α-спираль ↔ разупорядоченные структуры.

Далее мы исследовали гидродинамические свойства и структуру мономерной формы 14-3-3. Чтобы исключить влияние возможных агрегатов и остаточных димеров, мутантная форма ζmS58E была проанализирована непосредственно во время элюции с геле-фильтрационной колонки с помощью МУРР на синхротроне. Белок, нанесенный на ГФ колонку в довольно высокой концентрации (7,5 мг/мл), выявил на профиле элюции один основной симметричный пик и очень маленькое плечо (Рис. 112А). Анализ распределения R_g , рассчитанный с использованием аппроксимации Гинье для каждого измерения и затем усредненный по всем измерениям для пика, выявил почти неизменные значения $R_g \sim 23 \text{ \AA}$, указывающие на высокую монодисперсность частиц. Расчет молекулярной массы по пику с использованием *AutoPOROD* [414] также выявил почти постоянные значения со средним значением $26,6 \pm 0,7 \text{ кДа}$, в хорошем соответствии с ожидаемой массой мономера ζmS58E (27,9 кДа).

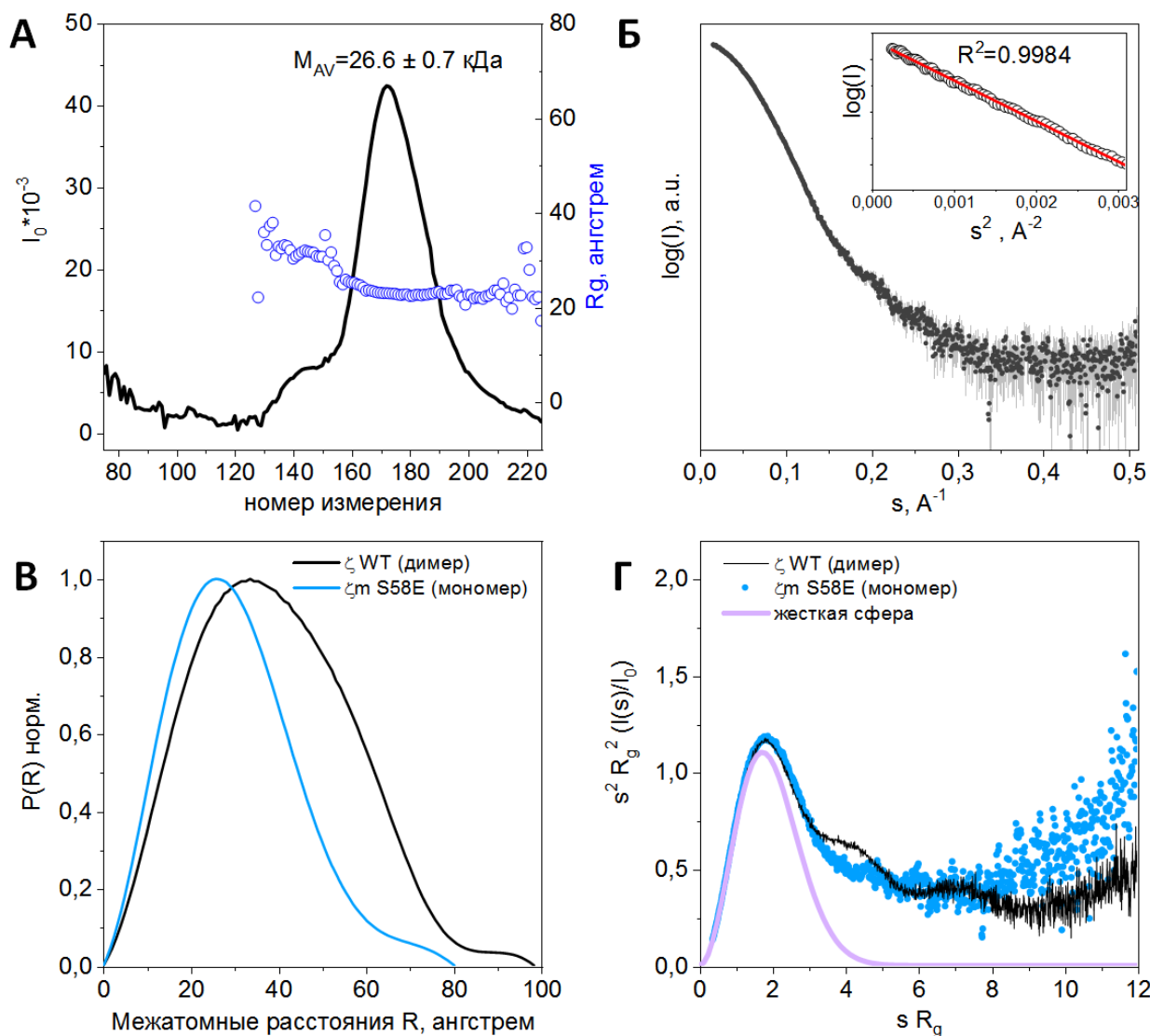


Рис. 112. Анализ гидродинамических параметров белка 14-3-3 ζ m-S58E. А. Профиль ГФ белка с колонки Shodex KW404-4F, в течение которого было сделано 240 измерений МУРР с помощью синхротронного излучения. После коррекции на рассеяние буфера интенсивность рассеяния при нулевом угле (I_0) была использована для построения профиля и определения распределения значений R_g , сглаженных впоследствии для уменьшения шума с помощью 3-кадрового скользящего окна. Указана молекулярная масса белка, рассчитанная в программе *DATASW* и усредненная по пику. Б. Профиль МУРР, полученный путем масштабирования и усреднения десяти кривых из максимума пика, представленного на панели А. Вставка показывает линейность области Гинье для полученной кривой. В. Распределение межатомных расстояний для 14-3-3 ζ WT и его варианта ζ mS58E. Г. Анализ гибкости/жесткости белков по безразмерным графикам Кратки. Для сравнения показан график для жесткой сферы.

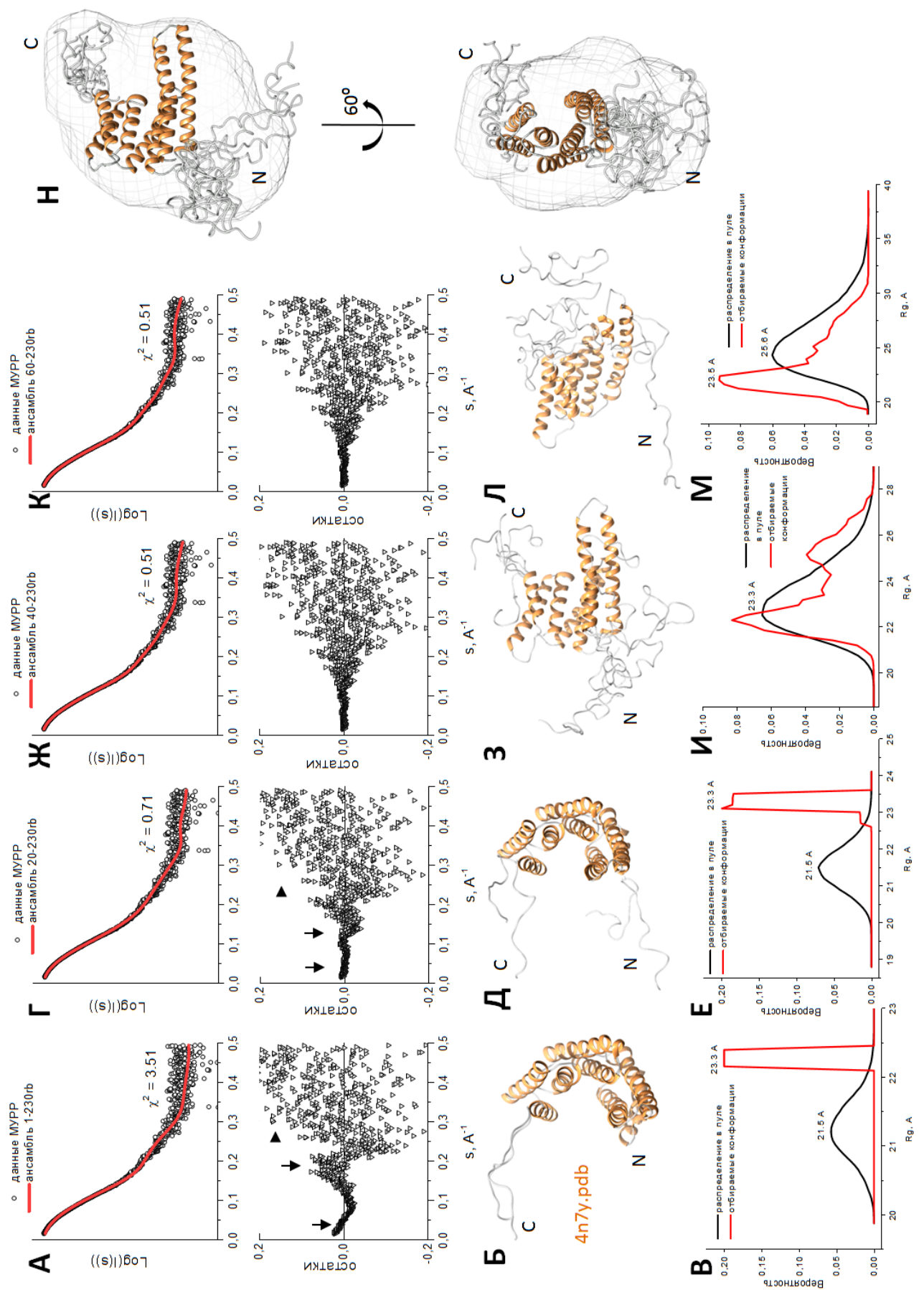


Рис. 113. Моделирование конформаций мономера 14-3-3 ζ в растворе на основе экспериментальных данных МУРР для белка 14-3-3 ζ m-S58E. А, Г, Ж, К. Описание данных моделями с различной длиной гибкой N-концевой области (0, 19, 39 или 59 остатков) с соответствующими остатками (residuals). С-конец (231-245 остатков) был гибким во всех случаях. Например, «20-230rb» означает, что из 245 первые 1-19 и последние 231-245 аминокислотных остатков были смоделированы как гибкие, а ядро 20-230 считалось твердым телом («rb», rigid body), как в структуре 4N7Y. Стрелками показаны расхождения. Б, Д, З, Л. Модели полученных ансамблей. В, Е, И, М. Сравнение ансамблей и исходных библиотек моделей со всеми возможными конформациями гибких частей в пределах соответствующего класса. Н. Модель структуры мономера 14-3-3 ζ в растворе, полученная с помощью метода EOM [428] (гибкие части, соответствующие остаткам 1-35 и 231-245, показаны серым, жесткая часть (остатки 36-230) соответствует кристаллической структуре 4N7Y и показана оранжевым). Ансамбль из десяти моделей мономера 14-3-3 ζ совмещен с *ab initio* оболочкой молекулы, рассчитанной из МУРР данных с использованием программ DAMMIN [426] (10 прогонов) и DAMAVER [427].

Для более точного анализа десять кривых, соответствующих максимуму пика на профиле элюции, были масштабированы и усреднены (Рис. 112Б). Линейность области Гинье подтвердила отсутствие взаимодействий между частицами, которые могли бы помешать дальнейшему анализу (Рис. 112Б, вставка). Значение D_{\max} для белка ζ mS58E составило 80,3 Å, то есть почти на 20 Å меньше, чем максимальный размер 14-3-3 ζ WT (Рис. 112В). Вычисление объема корреляции V_c – параметра, предложенного для точной оценки молекулярной массы как упорядоченных, так и разупорядоченных белков [425], позволило получить значение массы белка ζ mS58E 28,74 Да, что, в сочетании с другими параметрами, однозначно говорило о его мономерном состоянии.

Важно отметить, что на безразмерных графиках Кратки (Рис. 112Г) мутант ζ mS58E продемонстрировал наличие колоколообразного пика с максимумом при $\sim 2 q * R_g$, равном $\sim 1,2$, что характерно для глобулярных белков или доменов с хорошо свернутым ядром, независимо от их размера [644]. Это поведение было сходно с поведением глобулярного димерного белка WT (Рис. 112Г). В то же время при более высоких значениях $q * R_g$, где можно качественно определить наличие в белке гибких структурно разупорядоченных участков, мы наблюдали постепенный рост кривой, который в случае белка ζ mS58E был более выражен, чем у димерного 14-3-3 ζ WT. Такое поведение графика Кратки, скорее всего, означает, что мономер 14-3-3 ζ имеет свернутое ядро и гибкие участки.

Линейность области Гинье (Рис. 112Б, вставка) и монодисперсность частиц в основном пике белка (Рис. 112А), позволили нам смоделировать структуру мономера 14-3-3 ζ по данным МУРР (Рис. 112Б). Как было показано ранее (Рис. 23), димеры 14-3-3 в растворе могут быть хорошо описаны структурами кристаллографических димеров [289]. Вначале мы

предположили, что мономерный белок 14-3-3ζ в растворе может быть представлен кристаллографической субъединицей 14-3-3ζ, состоящей из жесткой части (остатки 1-230) и гибкого С-концевого сегмента (остатки 231-245). Исходя из этого предположения, мы создали *in silico* библиотеку конформеров с различным положением С-конца относительно жесткой части субъединицы 14-3-3ζ (код PDB 4N7Y) и попытались с помощью метода *EOM* (ensemble optimization method [428]) найти, какой набор конформеров лучшего всего описывает экспериментальные данные МУРР (в диапазоне от 0 до 0,5 Å⁻¹). Наши попытки выполнить *EOM* привели к достаточно хорошему соответствию экспериментальным данным, однако было четко видно несколько существенных несоответствий (Рис. 113А, стрелки), и все выбранные модели имели нереалистично вытянутый С-концевой сегмент (Рис. 113Б), представляющий собой скорее жесткий объект, а не гибкую структуру. Алгоритм *GAJOE* [428] выбирал только 1-2 модели из библиотеки в десяти независимых прогонах. Сравнение ансамбля, в данном случае состоящего всего лишь из 1-2 моделей, с начальной библиотекой из 10 000 моделей с исчерпывающей выборкой конформаций С-концевого сегмента показало, что у выбранных моделей были самые большие значения R_g (Рис. 113В). Это означало, что созданная библиотека не очень хорошо описывала реальные конформеры белка, так как средний размер конформеров в ней был значительно меньше, чем у частиц в растворе.

Основываясь на предсказании склонности к ID (Рис. 107 и Рис. 108), данных спектроскопии КД (Рис. 110 и Рис. 111) и безразмерных графиках Кратки (Рис. 112В), мы попытались учесть потенциальную гибкость N-концевой области при моделировании структуры мономера 14-3-3ζ. Когда мы сделали гибкой только первую α-спираль (остатки 1-19), наблюдалось некоторое улучшение описания экспериментальных данных, хотя в этом случае также были очевидны некоторые несоответствия (Рис. 113Г). К тому же, ансамбль состоял только из 1-2 отобранных моделей, вновь представленных нереалистично удлиненными N- и С-концами (Рис. 113Д), и происходил отбор из крайней правой части распределения размеров в библиотеке, состоящей из 10 000 новых моделей (Рис. 113Е).

Гибкость первых 39 остатков мономера 14-3-3ζ при *EOM* привела к идеальному соответствию с экспериментальными данными, с абсолютно равномерным описанием кривой на всем диапазоне данных рассеяния (Рис. 113Ж). В этом случае выбранные модели представляли собой полноценный ансамбль (6-10 моделей) с различными положениями N- и С-концов (Рис. 113З), охватывающий практически все размеры частиц в библиотеке

конформеров (Рис. 113И). В результате этого было получено достаточно реалистичное представление структуры.

Когда моделировались конформации первых 59 остатков, мы не наблюдали дальнейшего улучшения качества фитирования (Рис. 113К). Хотя выбранные модели представляли собой ансамбль из 5-11 моделей (Рис. 113Л), он имел значительно меньшие средние значения R_g , чем значения в соответствующей библиотеке из 10 000 новых моделей (Рис. 113М), и суперпозиция моделей в ансамбле показала значительное искажение общей структуры 14-3-3 (Рис. 113Л), не обоснованное другими данными. Хотя нельзя исключить, что значительная часть N-концевых спиралей 14-3-3 разворачивается, например, при нагревании (Рис. 111), кажется маловероятным, что модель с первыми ~60 разупорядоченными остатками (т.е. ~25% остатков 14-3-3) соответствует физиологическому мономеру 14-3-3. Это явно противоречит результатам спектроскопии КД (Рис. 110) и способности мономерного 14-3-3 взаимодействовать с фосфорилированными лигандами (Рис. 98 и Рис. 100), поскольку в этой активности участвуют в том числе остатки Lys49 и Arg56, которые для связывания фосфопептидов должны сохранять интактное взаимное расположение и α -спиральную конформацию.

В итоге мы обнаружили, что наряду с хорошо известной гибкостью C-концевого сегмента (остатки 231-245), гибкости первых 35 N-концевых остатков было достаточно для обеспечения наилучшего соответствия экспериментальным данным МУРР, КД-спектроскопии и предсказанной по последовательности склонности к ID (Рис. 113Н). Кроме того, полученный ансамбль моделей пространственно хорошо соответствовал молекулярной оболочке, полученной из *ab initio* анализа данных МУРР с помощью программ *DAMMIN* и *DAMAVAR* (Рис. 113Н) [414, 427, 645].

Таким образом, мы охарактеризовали конформацию мономеров 14-3-3 в растворе и выявили склонность к разупорядочиванию структуры, которая кодирована в N-концевой области белка, участвующей в образовании димерного интерфейса. С учетом конформационного полиморфизма, который обнаруживается не только в растворе у мономеров 14-3-3, но и в редких кристаллических структурах (Рис. 106), N-концевой сегмент белков 14-3-3 (первые ~40 остатков), по всей видимости, содержит характеристики скрытой или условной разупорядоченности, которая проявляется только при определенных обстоятельствах [633, 634]. Несмотря на наличие большого числа гидрофобных контактов и нескольких пар солевых мостов, стабилизирующих димеры 14-3-3, аминокислотных замен $^{12}\text{LAE}^{14} \rightarrow ^{12}\text{QQR}^{14}$ оказывается достаточно, чтобы полностью мономеризовать белок (Рис.

92 и Рис. 112). По-видимому, это обусловлено расположением этих остатков в консервативном кластере в N-концевой области, где они увеличивают склонность к ID, делая образование нормального димерного интерфейса 14-3-3 маловероятным и нестабильным. Эти предположения косвенно подтверждаются низкой устойчивостью мономерной формы 14-3-3 к протеолитическому расщеплению под действием трипсина и химотрипсина (Рис. 97). В этом случае, фрагменты с массой 20-22 кДа остаются устойчивыми к протеолизу, что указывает на эффективное расщепление первых 60-70 остатков, недоступных в димере 14-3-3. Можно предполагать, что склонность N-концевого сегмента 14-3-3 ($\alpha 1$ - $\alpha 2$ спирали в димерах 14-3-3, см. Рис. 107) к структурным перестройкам проявляется при диссоциации этих белков, что может сопровождать процесс обмена субъединицами между изоформами, а также, гипотетически, расширять круг функций 14-3-3. Важно отметить, что ввиду антипараллельности и симметричности димеров 14-3-3, их полная диссоциация не является необходимой для кратковременного проявления свойств димерного интерфейса, таких как склонность к структурной разупорядоченности и повышенная гидрофобность. В свете этого, в работе ученых из Австралии [646] был предложен «шагающий» механизм, изображенный на Рис. 114. Согласно такой гипотезе, частичное раскрытие димерного интерфейса с одной из сторон может быть промежуточным этапом при обмене субъединиц 14-3-3 при гомо- и гетеродимеризации, не требуя предварительно полной разборки димера 14-3-3.

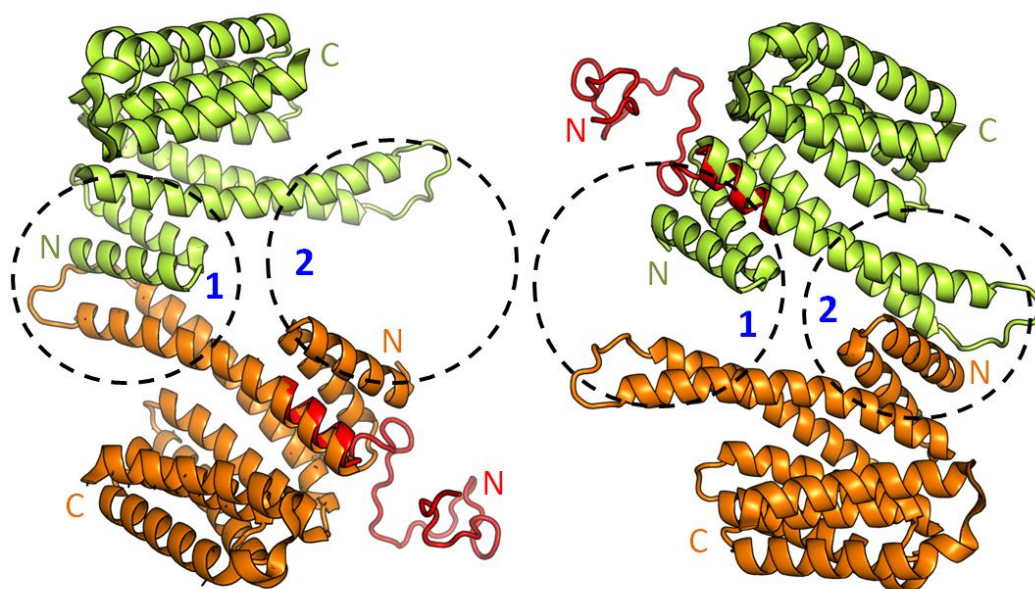


Рис. 114. Модель «шагающего» механизма, позволяющего димерам 14-3-3 осуществлять обмен субъединицами, раскрывая часть интерфейса, без полной мономеризации белка. Цифрами 1 и 2, а также штрихованными кружками отмечены две симметричных области, составляющие димерный интерфейс 14-3-3. Структурно разупорядоченная конформация N-концевого сегмента показана гибкой красной лентой.

3.3.7. Шапероно-подобная активность димерных и мономерных форм 14-3-3ζ

Сравнительно недавно была показана дополнительная, шапероно-подобная функция белков 14-3-3, которая заключается в предотвращении агрегации белков-субстратов и не зависит от их фосфорилирования [2, 131, 132, 183], однако механизм такой активности оставался загадочным. Было наглядно показано, что ни АБ ни гибкий С-концевой пептид, который обладает некоторой гомологией с аналогичным участком малых белков теплового шока, не играют принципиальную роль в шапероно-подобной активности 14-3-3 [131]. Сопоставив данные о том, что мономеры 14-3-3 обладают повышенной гидрофобностью (Рис. 94) и могут проявлять структурную разупорядоченность (Рис. 113), скрытые в димерах, с тем, что именно эти атрибуты зачастую характерны для белков-шаперонов [647-649], мы предположили, что область интерфейса может участвовать в антиагрегационной активности белков 14-3-3.

Для того чтобы проанализировать гидрофобность и шапероноподобную активность димерного и мономерного 14-3-3, мы использовали димерный белок 14-3-3ζ WT и его мономерную мутантную форму 14-3-3ζm. При всех условиях исследования (концентрация белка, ионная сила, рН) выбранные белки сохраняли ожидаемое олигомерное состояние (Рис. 92).

Белковые шапероны часто демонстрируют повышенную гидрофобность поверхности [650-653]. Это побудило нас более внимательно сравнить гидрофобные свойства димерного 14-3-3ζ WT и мономерного 14-3-3ζm. В соответствии с результатами ранее описанного эксперимента (Рис. 94), мы обнаружили, что интенсивность флуоресценции гидрофобного зонда бис-АНС в присутствии мономерного 14-3-3ζ была в 7-10 раз выше, чем в случае димера (Рис. 115А). Более высокая гидрофобность 14-3-3ζm дополнительно подтверждалась способностью только 14-3-3ζm, но не 14-3-3ζ WT, связываться с фенил-сефарозой, что было использовано при очистке мономерного 14-3-3ζ.

Мы также измерили температурную зависимость флуоресценции бис-АНС, связанной с 14-3-3ζ. В случае 14-3-3ζ WT мы обнаружили три различных области кривой графика (Рис. 115Б). В диапазоне 15-55 °С интенсивность флуоресценции комплексов 14-3-3/бис-АНС несколько снижалась из-за температурного тушения. В диапазоне 55-65 °С мы наблюдали резкое увеличение флуоресценции бис-АНС, связанной с 14-3-3ζ WT (Рис. 115Б), что отражало тепловой переход 14-3-3ζ (температура полуперехода ~ 61 °С, см. Рис. 95). За

тепловым переходом снова следовал участок температурного тушения при 63-70 °С (Рис. 115Б).

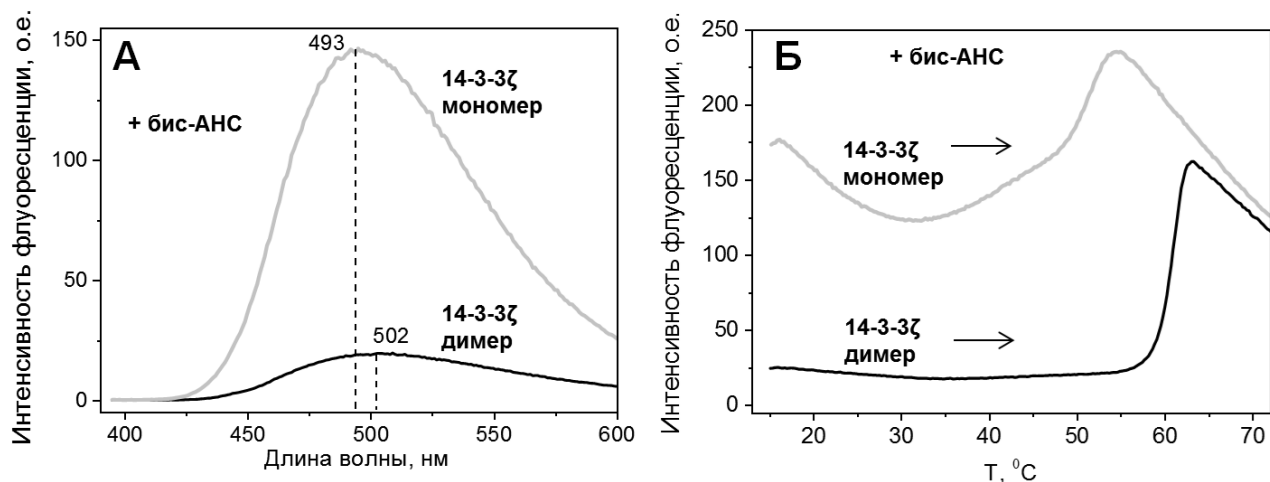


Рис. 115. Гидрофобность мономерной и димерной форм 14-3-3 ζ , исследованная с помощью флуоресцентного зонда бис-АНС. А. Спектры флуоресценции бис-АНС (11 мкМ) в присутствии 3,6 мкМ 14-3-3 ζ m или 14-3-3 ζ WT, записанные при 20 °С (длина волны возбуждения 385 нм). Каждый спектр представляет среднее пяти экспериментальных спектров. Б. Температурные зависимости флуоресценции бис-АНС (длина волны возбуждения 385 нм, эмиссии – 495 нм) в присутствии 14-3-3 ζ m или 14-3-3 ζ WT, зарегистрированные с постоянной скоростью нагрева 1 °С/мин. Стрелки показывают направление изменения температуры.

Аналогичная картина наблюдалась в случае 14-3-3 ζ m, за исключением того, что температурное тушение в диапазоне 15-30 °С было более выраженным, и тепловой переход происходил при более низкой температуре (~ 51 °С вместо ~ 61 °С), чем в случае 14-3-3 ζ WT (Рис. 115Б). Важно отметить, что мы наблюдали постепенное увеличение флуоресценции бис-АНС в интервале 36-45 °С, то есть до теплового перехода 14-3-3 ζ m. Эти результаты дополнили наши предыдущие данные, полученные с помощью ДСК (Рис. 95) и КД (Рис. 102), и предположили, что в интервале 36-45 °С в белке 14-3-3 ζ m происходит перестройка структуры, приводящая к некооперативному увеличению гидрофобности белка.

Таким образом, в отличие от 14-3-3 ζ WT, 14-3-3 ζ m обладает значительно более высокой гидрофобностью поверхности при различных температурах и демонстрирует структурные перестройки при 36-45 °С (то есть при нормальных физиологических температурах и тепловом шоке), связанные с изменением гидрофобности поверхности. Повышенная гидрофобность может быть важна для взаимодействия 14-3-3 с белками-субстратами в процессе антиагрегационного действия 14-3-3 в физиологических условиях и

в условиях теплового шока. На Рис. 116 представлены модели димера и мономера 14-3-3 ζ , на которых отмечено распределение участков с низкой (белые) или высокой (красные) гидрофобностью поверхности.

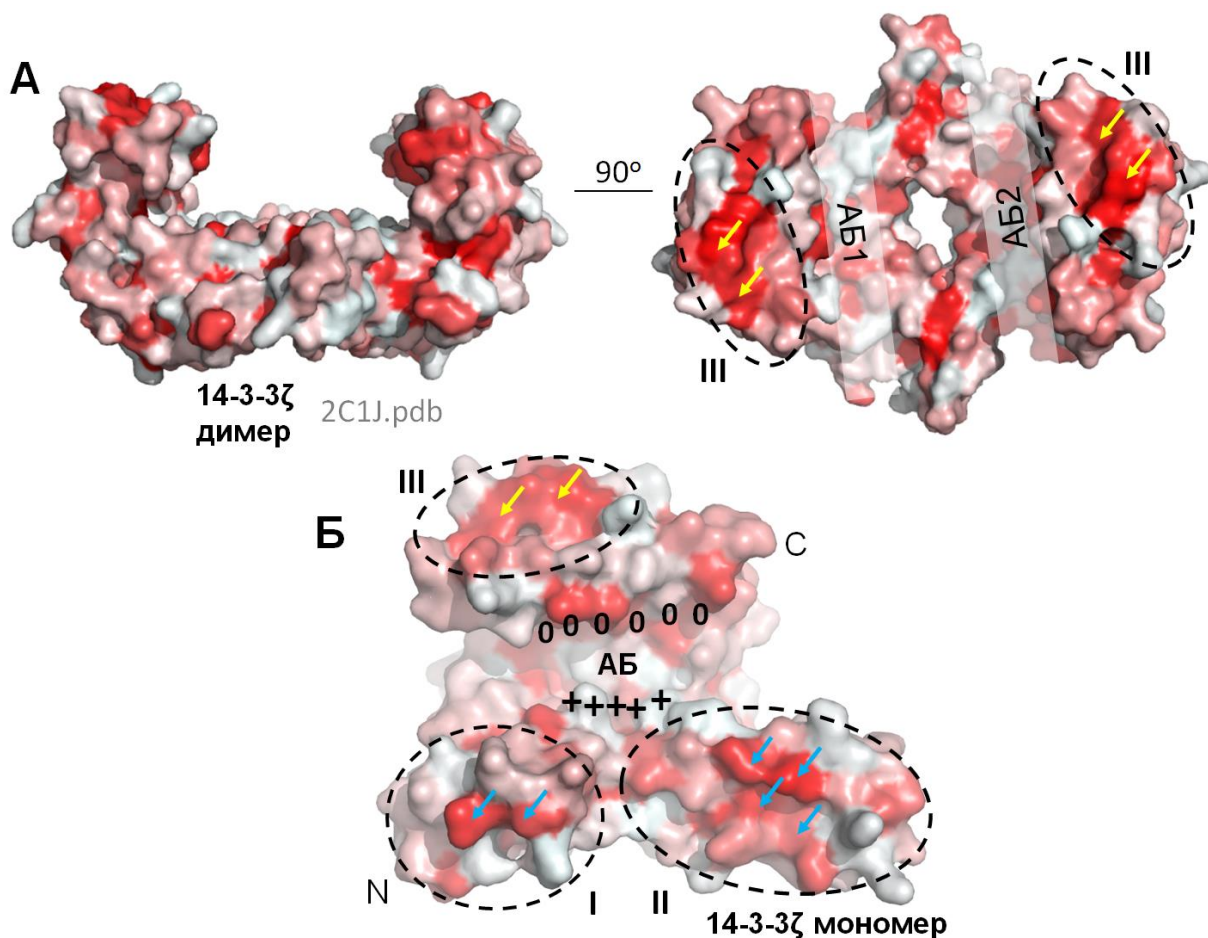


Рис. 116. Гидрофобность поверхности димера 14-3-3 ζ человека (А) и его субъединицы (вид со стороны интерфейса) (Б), окрашенных согласно шкале гидрофобности [654] от белого (полярный) до красного (гидрофобный). Пунктирными овалами обозначены области I-III с высокой гидрофобностью, без учета амфипатической бороздки (АБ). Синие стрелки указывают на гидрофобные кластеры интерфейса, уникальные для мономера 14-3-3, а желтые стрелки указывают на гидрофобные кластеры, присутствующие как на димерах, так и на мономерах. *Кластер I:* Leu6, Leu12, Ala13, Ala16 и Ala24. *Кластер II:* Val51, Ala54, Val61, Val62, Ile65, Ala72, Met78, Ala79, Tyr82, Ile86 и Ile93. *Кластер III:* Phe196, Ile200, Leu203 и Leu206. Показано расположение гидрофобных («0») и положительно-заряженных («+») сторон АБ.

ДТТ-индуцированное восстановление дисульфидных связей лизоцима и инсулина приводит к частичной денатурации и агрегации этих белков, что сопровождается увеличением оптической плотности при 360 нм и/или интенсивности светорассеяния [655-658]. Обе формы 14-3-3 ζ ускоряли ДТТ-индуцированную агрегацию лизоцима. Проагрегационный эффект 14-3-3 ζ m был более выражен (Рис. 117А; кривые 4, 5), чем в случае

димерного 14-3-3 ζ (Рис. 117А; кривые 2, 3), и в обоих случаях эффект усиливался при более высоких концентрациях 14-3-3 (Рис. 117А; кривые 3, 5). В то же время сами по себе белки 14-3-3 в выбранных условиях не агрегировали (Рис. 117А; кривая 0). Анализ белкового состава растворимых и нерастворимых фракций в конце инкубации показал, что обе формы 14-3-3 ζ не были способны предотвратить осаждение денатурированного лизоцима и соосаждались с ним (данные не показаны), что указывало на их прочное взаимодействие.

Специализированный белок-шаперон В6, член семейства sHSP, также стимулировал ДТТ-индуцированную агрегацию лизоцима в дозо-зависимом режиме (Рис. 117Б). В этом отношении его действие было сходным с таковым у 14-3-3 ζ . Качественно подобные эффекты наблюдались при разных температурах (данные не показаны).

Таким образом, в указанных условиях с лизоцимом в качестве модельного субстрата мы не смогли выявить анти-агрегационное действие ни одного из выбранных шаперонов.

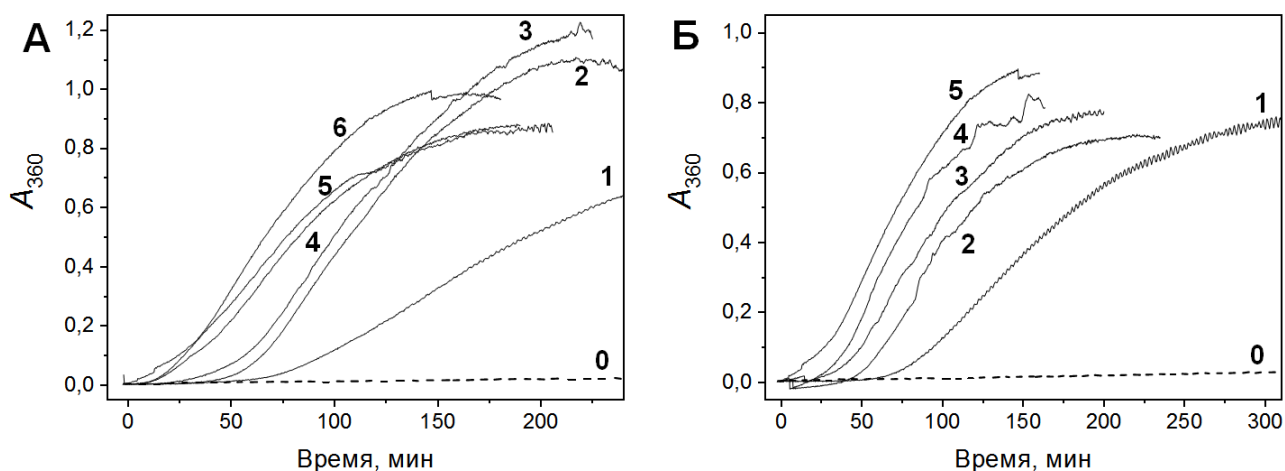


Рис. 117. Влияние димера и мономера 14-3-3 ζ на ДТТ-индуцированную агрегацию лизоцима (0,4 мг/мл) при 25 °С. А. Кинетика агрегации лизоцима, измеренная по поглощению при 360 нм (A_{360}) в отсутствие (1) или в присутствии 0,1 (2) или 0,2 мг/мл (3) 14-3-3 ζ WT или 0,1 (4) или 0,2 мг/мл (5) 14-3-3 ζ m. Для сравнения кривая 6 показывает кинетику агрегации лизоцима в присутствии 0,4 мг/мл В6. В. Кинетика агрегации лизоцима в отсутствие (1) или в присутствии 0,05 (2), 0,1 (3), 0,2 (4) или 0,4 мг/мл (5) В6. Кривые 0 на обеих панелях указывают на отсутствие агрегации 14-3-3 и В6 в отсутствие лизоцима.

Как димерный, так и мономерный 14-3-3 ζ уменьшали прирост светорассеяния, связанный с ДТТ-индуцированной агрегацией В-цепи инсулина, и их шапероноподобный эффект зависел от концентрации белка (Рис. 118А-Г). Кроме того, при молярных соотношениях инсулин/шаперон 1:0,5-1:1 обе олигомерные формы 14-3-3 ζ увеличивали лаг-фазу (Рис. 118В и Г). При всех молярных соотношениях инсулин/шаперон (1:0,08-1:1) 14-3-3 ζ m был более эффективен в замедлении ДТТ-индуцированной агрегации инсулина, чем 14-3-3 ζ WT (Рис. 118А-Г). Эти результаты были подтверждены методом динамического

светорассеяния (ДСР) (Рис. 118Д и Е). При молярном соотношении инсулин/14-3-3 ζ , равном $\sim 1:0,5$, 14-3-3 ζ m значительно замедлял прирост интенсивности светорассеяния, связанного с агрегацией инсулина, тогда как 14-3-3 ζ WT был менее эффективным (Рис. 118Д). Оценка радиусов (R_h) образовавшихся частиц показала, что 14-3-3 ζ WT почти не влиял на средний размер агрегатов на протяжении всего эксперимента (Рис. 118Е). 14-3-3 ζ m вызывал уменьшение среднего размера агрегатов в начале инкубации, но средний размер агрегатов на более поздних стадиях агрегации оставался большим (Рис. 118Е). Таким образом, общий антиагрегационный эффект 14-3-3 ζ m можно объяснить уменьшением количества образованных агрегатов, а не уменьшением их среднего размера, особенно на более поздних стадиях агрегации. Обе формы 14-3-3 ζ обладали более низкой шапероноподобной активностью, чем белок В6, который, в соответствии с ранее опубликованными результатами [132], почти полностью предотвращал агрегацию инсулина уже при молярном соотношении инсулин/шаперон $\sim 1:0,5$ (Рис. 118А-Г).

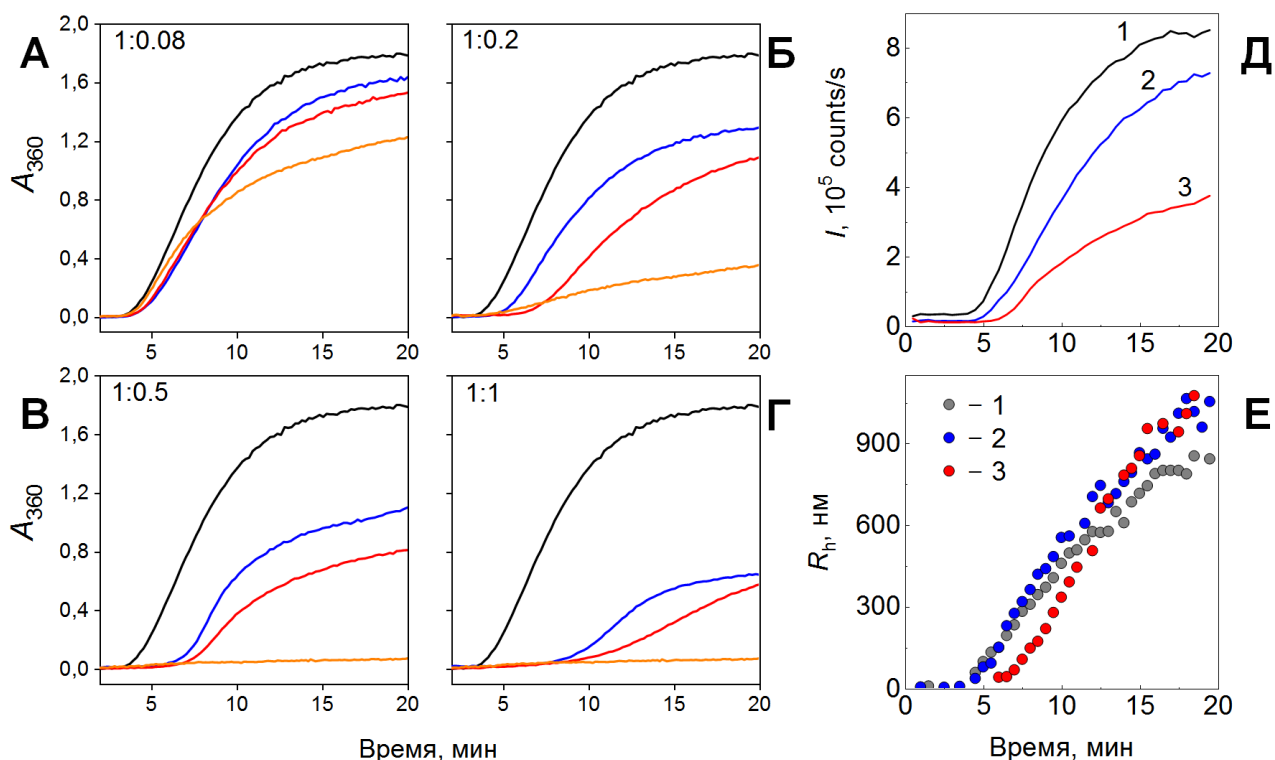


Рис. 118. Влияние олигомерных форм 14-3-3 ζ на ДТТ-индуцированную агрегацию инсулина (0,24 мг/мл) при 37 °С. А-Г. Кинетика агрегации инсулина, измеренная по поглощению при 360 нм (A_{360}) в отсутствие (черные кривые) или в присутствии димерного (синие кривые) или мономерного (красные кривые) 14-3-3 ζ , а также В6 (оранжевые кривые) при разных молярных соотношениях субстрат/шаперон (указаны на панелях). Д. Кинетика изменения интенсивности светорассеяния (I) и среднего гидродинамического радиуса (R_h) (Е) агрегатов, образующихся в ходе ДТТ-индуцированной агрегации инсулина в отсутствие (1) или в присутствии 0,6 мг/мл димерного (2) или мономерного (3) 14-3-3 ζ .

Таким образом, обе олигомерные формы 14-3-3 ζ , а также белок В6 не могли предотвратить ДТТ-индуцированную агрегацию лизоцима, но продемонстрировали выраженную антиагрегационную активность с инсулином в сходных условиях. Поскольку шапероноподобная активность может зависеть не только от природы субстрата, но и от способа его денатурации, мы проанализировали влияние 14-3-3 ζ видов на тепловую агрегацию нескольких модельных белков-субстратов. Поскольку 14-3-3 ζ m обладает относительно низкой термостабильностью (температура полуперехода равна ~51 °С), мы подобрали модельные белки-субстраты, которые агрегируют при температурах ниже 45 °С, т.е. до начала необратимого теплового перехода 14-3-3 ζ m.

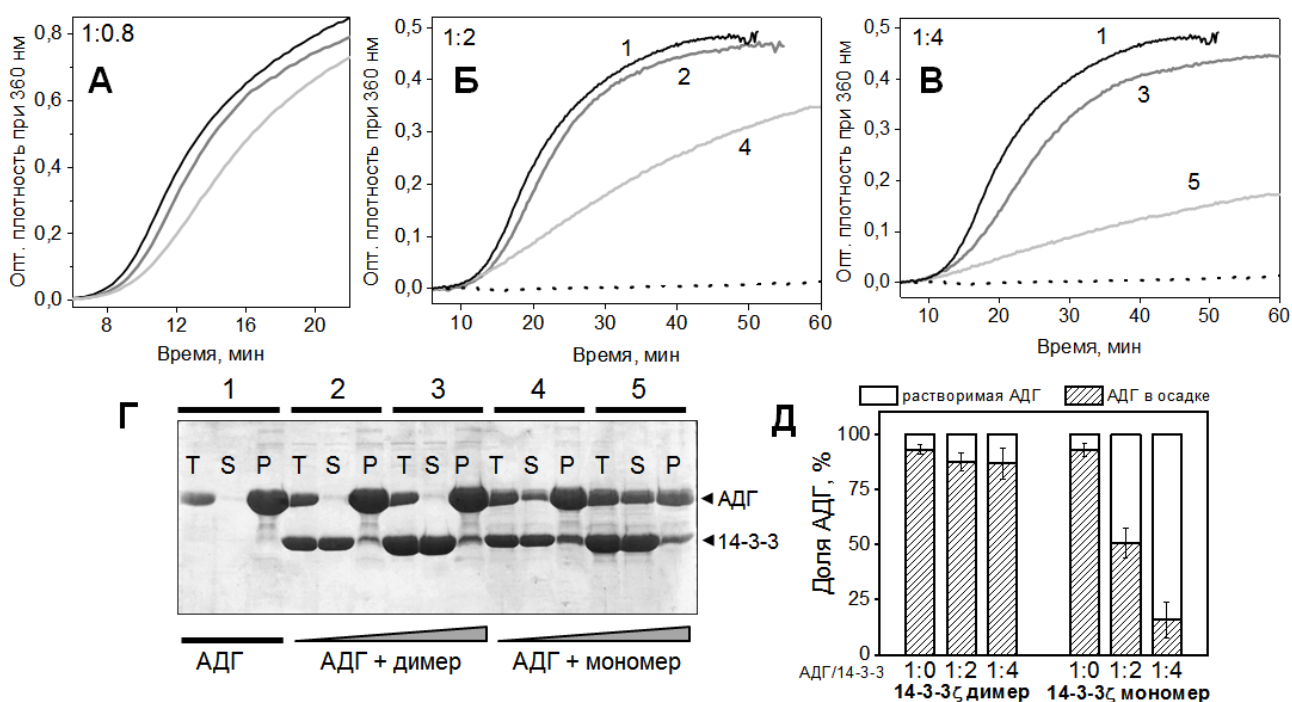


Рис. 119. Влияние димера и мономера 14-3-3 ζ на тепловую агрегацию АДГ при 42 °С. Кинетика агрегации АДГ (0,4 (А) или 0,2 (Б,В) мг/мл), в отсутствие (черный) или в присутствии димера (темно-серый) или мономера (светло-серый) 14-3-3 ζ при указанных молярных соотношениях АДГ/14-3-3. Пунктирные линии (Б,В) показывают отсутствие агрегации 14-3-3 без АДГ. Г. Содержание белка в тотальной (Т), растворимой (S) и осадочной (P) фракциях образцов 1-5, указанных на панелях Б и В, по данным ДСН-электрофореза с окрашиванием Кумасси. Положения АДГ (~37 кДа) и 14-3-3 (~30 кДа) отмечены стрелками. Треугольниками показано увеличение соотношения АДГ/14-3-3. Д. Распределение АДГ между растворимой (белой) и осадочной (заштрихованной) фракциями в отсутствие или в присутствии 14-3-3 ζ . Приведены значения ошибок (SD) при денситометрии двух гелей.

В присутствии ЭДТА агрегация Zn-связанной АДГ [394] может быть индуцирована при 42 °С (Рис. 119А-В) [131]. В этих условиях как димеры, так и мономеры 14-3-3 ζ не проявляли каких-либо признаков агрегации даже после 2 ч инкубации (Рис. 119Б и В;

пунктирные кривые). В выбранных условиях добавление 14-3-3 ζ WT оказало лишь небольшое влияние на агрегацию АДГ, и этот эффект почти не зависел от концентрации 14-3-3 ζ (Рис. 119А-В, Г, дорожки «2» и «3» на геле). В отличие от 14-3-3 ζ WT, 14-3-3 ζ m был намного более эффективным, особенно при высокой концентрации белка (Рис. 119А-В; светло-серые линии). Мы проанализировали белковый состав растворимых и нерастворимых фракций в конце инкубации с помощью ДСН-электрофореза и количественной денситометрии. Как и ожидалось, в указанных условиях 14-3-3 ζ WT не смог предотвратить преципитацию АДГ и частично осаждался вместе с денатурированной АДГ (Рис. 119Г и Д). В то же время, 14-3-3 ζ m эффективно предотвращал преципитацию АДГ, сохраняя большую ее часть в растворимом состоянии (Рис. 119Г и Д), хотя также частично осаждался с АДГ. По данным литературы [308], даже при низких концентрациях белок В6 почти полностью предотвращает агрегацию АДГ.

Как было показано ранее, ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} индуцируют изменения третичной и четвертичной структуры гексадодекамера киназы фосфоорилазы PhK (1320 кДа) и тем самым стимулируют образование олигомеров PhK высокого порядка [352, 353, 395-398]. Хотя PhK не является обычным модельным субстратом для тестирования антиагрегационной активности, некоторые данные указывают, что при определенных условиях малые белки теплового шока взаимодействуют с PhK и предотвращают образование ее крупных олигомеров [351, 352].

По данным ДСР, при двух разных концентрациях 14-3-3 ζ WT практически не влиял на агрегацию PhK (Рис. 120А; кривые 2, 3). В то же время 14-3-3 ζ m заметно уменьшал агрегацию PhK, и этот эффект зависел от концентрации 14-3-3 (Рис. 120А; кривые 4, 5). Мы также проанализировали радиусы (R_h) частиц, накопленных в ходе агрегации PhK, и обнаружили, что 14-3-3 ζ WT немного снижал значения R_h только при высокой концентрации (Рис. 120Б; кривая 3), тогда как 14-3-3 ζ m существенно уменьшал размер частиц даже при низкой концентрации (Рис. 120Б; кривые 4, 5).

Когда агрегация PhK индуцировалась в присутствии В6, мы наблюдали лишь умеренное концентрационно-зависимое уменьшение агрегации PhK, судя по уменьшению интенсивности (Рис. 120В) и размеру образовавшихся частиц (Рис. 120Г). Антиагрегационный эффект В6 был гораздо менее выраженным, чем у 14-3-3 ζ m (Рис. 120). Мы попытались использовать другой представитель sHSP, а именно белок В5, чтобы сравнить его эффект с эффектом 14-3-3 ζ m.

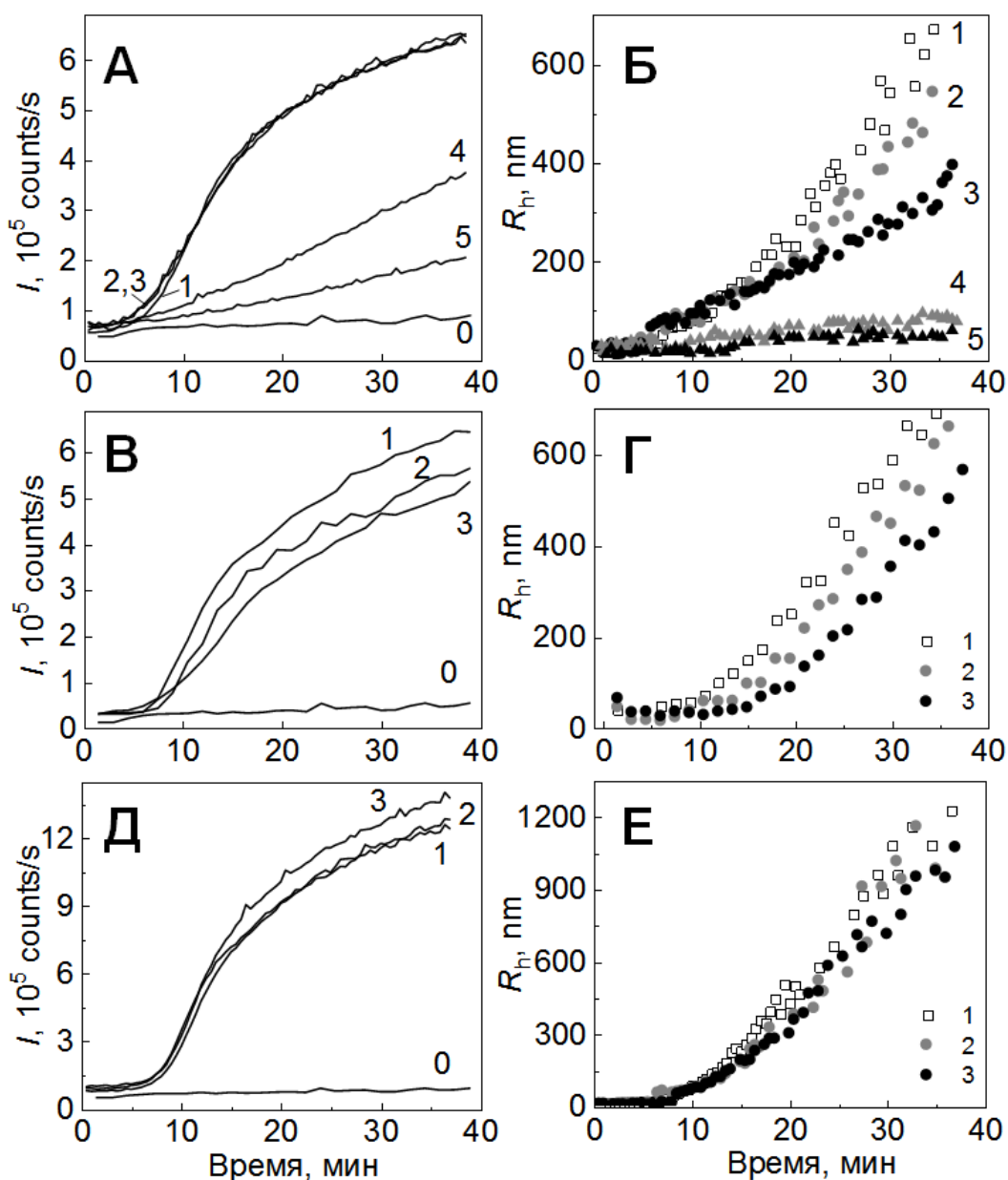


Рис. 120. Влияние олигомерных форм 14-3-3 ζ (А, Б), В6 (В, Г) и В5 (Д, Е) на тепловую агрегацию киназы гликогенфосфорилазы (PhК) в присутствии Ca^{2+} и Mg^{2+} при 40 °С. А, В. Кинетика изменения интенсивности светорассеяния (I) и среднего гидродинамического радиуса (R_h) (Б, Г) агрегатов, образующихся в ходе агрегации PhК (0,1 мг/мл) в отсутствие (1) или в присутствии 0,1 (2) или 0,2 (3) мг/мл димера 14-3-3 ζ или 0,1 (4) или 0,2 (5) мг/мл мономера 14-3-3 ζ (А, Б) или в отсутствие (1) или в присутствии 0,1 (2) или 0,2 (3) мг/мл В6 (В, Г). Д. Кинетика изменения I и R_h (Е) агрегатов PhК (0,2 мг/мл) в присутствии следующих концентраций В5: 0 (1), 0,21 (2) или 0,4 мг/мл (3). Кривая 0 на панелях А, В, Д указывает на отсутствие агрегации шаперонов.

При выбранных концентрациях В5 не был способен предотвратить агрегацию PhК и не оказывал видимого влияния на размер частиц PhК, накапливающихся в процессе агрегации (Рис. 120Д и Е). В этом отношении эффект В5 был аналогичен эффекту 14-3-3 ζ

WT. Таким образом, в указанных условиях антиагрегационный эффект на PhK увеличивался в следующем ряду: B5 ~ 14-3-3 ζ WT < B6 < 14-3-3 ζ m.

Далее мы исследовали способность димера и мономера 14-3-3 ζ предотвращать агрегацию субфрагмента 1 миозина (S1) в качестве модельного субстрата, который ранее был успешно использован для анализа агрегации белка [659] и шапероноподобной активности малого белка теплового шока HSPB1 (HSP27) [660]. Инкубация S1 при температуре теплового шока (42-45 °C) вызывает его агрегацию, легко детектируемую с помощью спектроскопических методов, а также визуально. S1 инкубировали при 43 °C, и влияние 14-3-3 ζ m или димерного 14-3-3 ζ WT на кинетику агрегации S1 оценивали, измеряя оптическую плотность при 360 нм. Обе формы 14-3-3 ζ подавляли агрегацию S1 в зависимости от концентрации белка (Рис. 121). При всех исследованных весовых соотношениях S1:14-3-3 ζ (в диапазоне 1:0,1-1:1) мономер 14-3-3 был намного более эффективным, чем димерный 14-3-3 ζ WT (Рис. 121А-Г). Например, при весовом соотношении S1:14-3-3 ζ , равном 1:1, мономерный 14-3-3 почти полностью предотвращал вызванную температурой агрегацию S1, тогда как димерный 14-3-3 лишь слегка задерживал агрегацию S1 (Рис. 121А).

Мы также сравнили антиагрегационную активность белка B6 и 14-3-3 ζ . В выбранных условиях димерный 14-3-3 ζ WT и B6 обладали примерно одинаковой, умеренной антиагрегационной активностью, замедляя агрегацию S1 (Рис. 121Б, кривые 2 и 4). В то же время мономерный 14-3-3 ζ m обладал значительно более высокой антиагрегационной активностью, действуя как эффективный белок-шаперон (Рис. 121Б, кривые 3 и 5).

Недавно было показано, что 14-3-3 ζ m и B6 эффективно предотвращают агрегацию УФ-облученной гликогенфосфорилазы Б, причем добавление 0,1 М аргинина стимулирует антиагрегационный эффект обоих белков-шаперонов [661].

Агрегация белка является центральным событием в ряде патологических процессов [662, 663] и может также происходить при нормальных физиологических условиях [664]. Агрегация поврежденных белков предотвращается системой специализированных белков-шаперонов [665, 666], которые экспрессируются в клетке конститутивно, а также могут индуцироваться в ответ на стрессовые воздействия [448, 667, 668]. Помимо специализированных шаперонов известны белки, для которых шапероно-подобная функция второстепенна (moonlighting activity) и может быть «включена» стрессовым воздействием, вызывающим, например, изменение олигомерного состояния таких вспомогательных белков-шаперонов. Интересными примерами многофункциональных белков, для которых описана

шапероно-подобная активность, являются растительные тиоредоксиноподобные белки AtTDX [669], лейцин-аминопептидазы [670] и пероксиредоксины из дрожжей [671]. Кроме того, некоторые рибосомные белки проявляют выраженную шапероноподобную активность при стресс-индуцированной разборке рибосом [672]. Недавно было показано, что недиссоциированные гибернирующие рибосомы могут помогать системе шаперонов, проявляя шапероно-подобную активность [673].

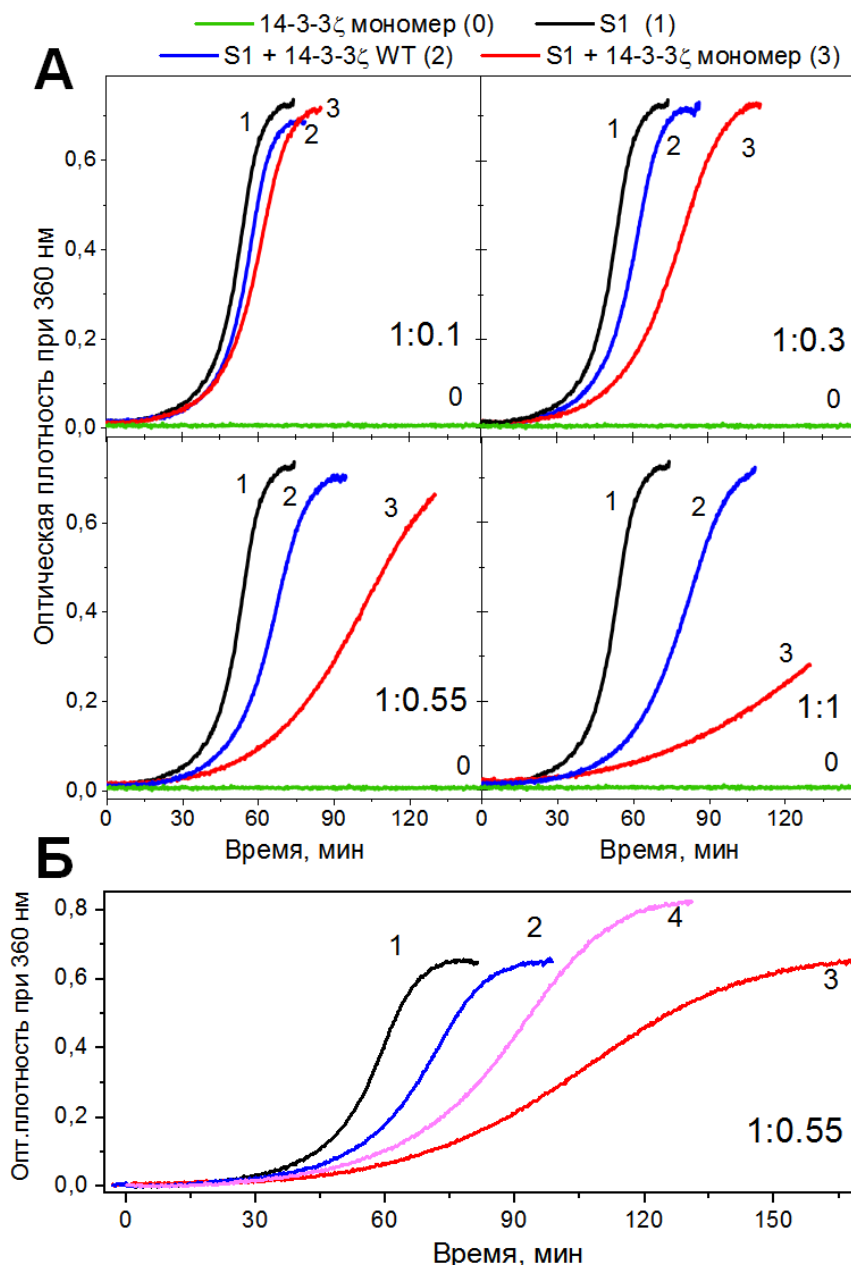


Рис. 121. А. Агрегация S1 миозина (0,46 мг/мл) в отсутствие (1) или в присутствии 14-3-3ζ димера (2) или мономера (3) при 43 °С при различных весовых соотношениях S1:14-3-3 (указаны на панелях). Кривая 0 показывает отсутствие агрегации шаперонов в условиях эксперимента. Б. Сравнение шапероноподобной активности 14-3-3ζ (2 – димер, 3 – мономер) и B6 (4) при весовом соотношении S1:шаперон равном 1:0,55. Кривая 1 – агрегация свободного S1.

Специализированные белки-шапероны также могут подвергаться стресс-индуцированной диссоциации, приводящей к образованию нескольких активных олигомеров или субъединиц из одного неактивного/менее активного предшественника – крупного олигомера. При повышении кислотности таким образом диссоциируют димерные HdeA и HdeB, мономеры которых проявляют антиагрегационную активность по отношению к различным субстратам [674, 675]. Аналогично, в ответ на легкий ацидоз внеклеточный белок-шаперон кластерин диссоциирует на мономеры с более высокой поверхностной гидрофобностью и повышенной шапероноподобной активностью [650, 676]. В некоторых случаях разборка олигомеров малых белков теплового шока также может быть необходима для функционирования [305, 351, 448, 660, 677]. Недавно было показано, что вызванное изменением редокс-потенциала клетки локальное разворачивание β -складки HSPB1, участвующей в его димеризации, определяет высокую шаперонную активность мономеров этого белка [649].

Можно предположить, что димеры 14-3-3, которые представлены в клетках в больших концентрациях, также являются вспомогательными белками-шаперонами, функционирующими в условиях, когда система специализированных шаперонов клетки перегружена [192]. Возникает резонный вопрос: какие структурные элементы отвечают за шапероноподобную активность белков 14-3-3? Было показано, что С-концевой гибкий сегмент 14-3-3 ζ , гомологичный таковому у sHSP, не может объяснить шапероно-подобную активность 14-3-3, поскольку усеченный вариант белка также ее проявляет [131]. Гипотеза о роли гидрофобной части амфипатической бороздки 14-3-3 в антиагрегационной активности 14-3-3 [678] была опровергнута, поскольку пептид R18, который блокирует бороздку, не влияет на шапероно-подобную активность 14-3-3 [131].

Ввиду того, что мономеры 14-3-3 ζ , обладающие повышенной поверхностной гидрофобностью и структурной пластичностью N-концевой области, проявляют более эффективную антиагрегационную активность по отношению к белкам-субстратам с разными механизмами агрегации, чем димерный белок, и в некоторых случаях даже чем белки-шапероны B6 и B5, мы предполагаем, что димерный интерфейс 14-3-3 служит ключевой областью, которая обуславливает наличие у 14-3-3 шапероно-подобной активности. Димерная структура 14-3-3, по-видимому, не является обязательной для проявления шапероно-подобной активности. Антиагрегационный эффект мономера 14-3-3 ζ зависит от концентрации белка. Это делает весьма привлекательной гипотезу о том, что по крайней мере в некоторых условиях клетка может извлечь выгоду из способности димеров 14-3-3

распадаться на мономеры, обладающие шаперонным потенциалом. Можно предположить, что переход от димерных к мономерным формам 14-3-3 опосредуется некоторыми протеинкиназами, активируемыми сигналами стресса, такими как МАРКАР 2 киназа [118], в ущерб функциям 14-3-3, которые строго зависят от димерного состояния, но в пользу шапероно-подобного функционирования 14-3-3.

В то же время, димерная форма 14-3-3 также способна подавлять агрегацию белков-субстратов в концентрационно-зависимом режиме, пусть и менее эффективно, чем искусственно полученные мономеры (например, на S1 – см. Рис. 121 и [131]). Мы предполагаем, что за эту функциональность также отвечает область димеризации белка, при этом полной диссоциации димера 14-3-3 может не происходить. Действительно, благодаря антипараллельности структуры, только одна половина может участвовать в связывании белка-субстрата, а вторая – стабилизировать димер, согласно «шагающему» механизму, схематично изображенному на Рис. 114 и Рис. 122. Работы австралийских коллег так же предполагают подобный механизм [646].

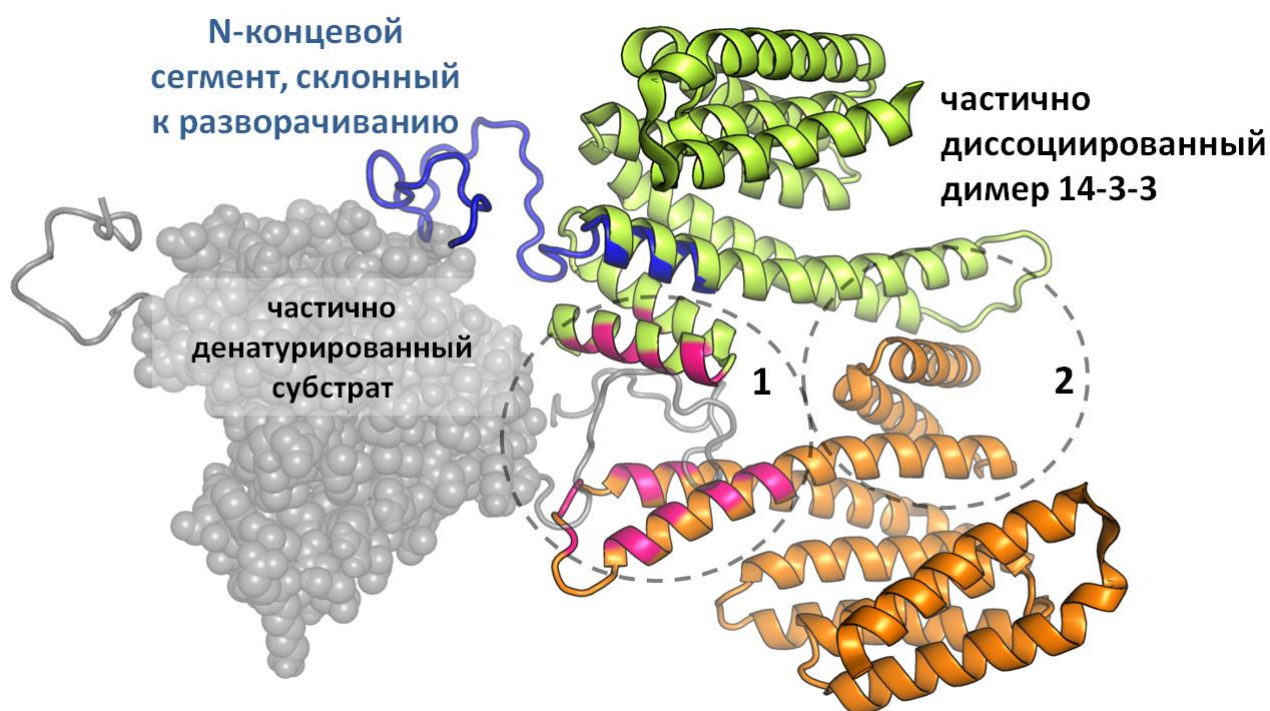


Рис. 122. Гипотетическая схема, иллюстрирующая возможный механизм шапероно-подобной активности димеров 14-3-3. Механизм основан на частичной диссоциации димера 14-3-3 и взаимодействии зоны димеризации на одной стороне димера (отмечена пурпурным), характеризующейся повышенной поверхностной гидрофобностью и склонностью к структурной разупорядоченности (синий), с частично денатурированным белком-субстратом (полупрозрачный серый) для предотвращения его агрегации. Ввиду антипараллельности димера 14-3-3, его полная диссоциация при таком механизме необязательна, и только одна из половин интерфейса (1) может контактировать с субстратом, а вторая (2) продолжает стабилизировать димер.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С привлечением классических и современных методов биохимии, биофизики, молекулярной и структурной биологии проведено подробное структурно-функциональное исследование, в результате которого установлен молекулярный механизм взаимодействия 14-3-3 с белком HSPB6, участвующим в регуляции расслабления гладких мышц бронхов и сосудов. Впервые определены пространственные структуры комплекса 14-3-3 с полноразмерным белком HSPB6 и его фрагментами, что позволило выявить ключевые молекулярные интерфейсы, привлекательные с точки зрения подбора малых молекул с терапевтическим потенциалом. Комплексный подход к изучению взаимодействия между белками 14-3-3 и HSPB6 показал состоятельность для получения структурной информации, несмотря на сложности, связанные с необходимостью стехиометрического сайт-специфического фосфорилирования и наличием протяженных неструктурированных элементов в выбранном белке-партнере 14-3-3.

С учетом полученного опыта разработано несколько подходов для более быстрого и удобного получения фосфорилированных белков и комплексов 14-3-3, облегчающих структурные исследования, в том числе в высокопоточном формате, который особенно востребован при интерактивных исследованиях. Продемонстрирована применимость разработанного подхода, основанного на химерах 14-3-3 с фосфопептидами белков-партнеров, для решения структур физиологически значимых комплексов, перспективных с точки зрения разработки лекарств. Получены первые структуры комплексов 14-3-3 с фосфорилированными фрагментами стероидогенного регуляторного белка STARD1 и онкобелка E6 вируса папилломы человека. В случае E6 не только впервые установлены две структуры 14-3-3 с фосфорилированным С-концевым мотивом вида pS/pTXX-COOH, но и показана селективность действия широко известного стабилизатора взаимодействий с участием 14-3-3, фузикокина. В отличие от большинства описанных случаев стабилизации комплексов 14-3-3, в случае комплексов 14-3-3/E6 фузикокин оказывал умеренное ингибирующее действие, связываясь в амфипатической бороздке 14-3-3 одновременно с фосфопептидами E6 с образованием тройного комплекса, который мы смогли закристаллизовать. С учетом высокого пространственного разрешения, эти структурные данные могут помочь в разработке как ингибиторов, так и стабилизаторов взаимодействия 14-3-3 с E6 (и белками других вирусов, имеющих pS/pTXX-COOH мотивы), что представляет значительный интерес в развитии подходов к борьбе с целым рядом вирусных инфекций в будущем.

С помощью сайт-направленного мутагенеза получена релевантная модель мономерной формы белка 14-3-3 ζ , детально исследованы ее структурные и функциональные свойства. Проведен аккуратный сравнительный анализ свойств мономеров и димеров белков 14-3-3, а также впервые получена модель структуры мономеров 14-3-3 в растворе. Обнаруженные отличительные свойства мономеров 14-3-3 (повышенная гидрофобность и склонность к структурной разупорядоченности, скрытая в последовательности N-концевой области 14-3-3) позволили предположить и доказать наличие у мономеров 14-3-3 антиагрегационной активности по отношению к нескольким модельным белкам-субстратам с различным механизмом агрегации. Полученные данные позволили впервые соотнести структурные особенности 14-3-3 с их антиагрегационной активностью, широко описанной в литературе, а также предложить механизм, объясняющий наличие антиагрегационной активности у димеров 14-3-3 за счет частичного экспонирования межсубъединичного интерфейса. Таким образом, обнаруженная нами склонность к структурной разупорядоченности 14-3-3, скрытая в их N-концевой области, может проявляться при мономеризации белка, при обмене субъединицами с образованием различных гетеродимеров 14-3-3, а также при функционировании этих белков как шаперонов.

ВЫВОДЫ

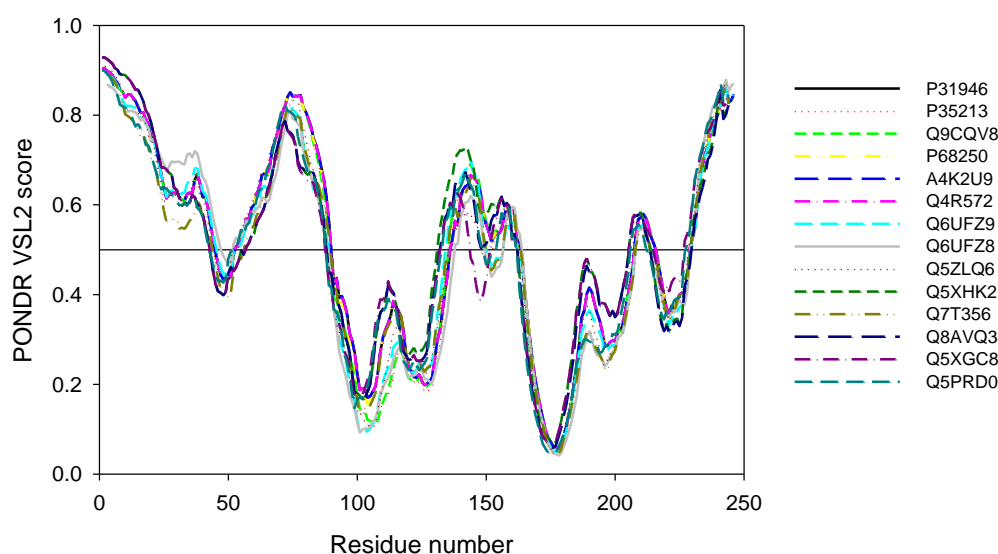
1. Впервые установлена трехмерная структура полноразмерного малого белка теплового шока HSPB6 в комплексе с универсальным регуляторным белком 14-3-3, и локализованы участки, применимые для создания фармакологических соединений, способных регулировать взаимодействие этих белков и сократительную активность гладких мышц.
2. Установлен механизм образования, прочность и стехиометрия комплекса 14-3-3 с фосфорилированным HSPB6, показана ключевая роль связывания фосфопептида RRApS¹⁶APLP HSPB6 в амфипатической бороздке 14-3-3. Ионы фосфата ингибируют это взаимодействие за счет блокирования амфипатических бороздок 14-3-3.
3. Разработана высокоэффективная система, обеспечивающая ко-экспрессию целевых белков и протеинкиназы A в клетках *E.coli*. Этот подход облегчает получение белков с высокой степенью фосфорилирования.
4. Разработан оригинальный метод получения структур комплексов 14-3-3 с фосфопептидами белков-партнеров, основанный на создании химерных конструкций 14-3-3-пептид и их ко-экспрессии с протеинкиназой A. Эффективность метода продемонстрирована при получении новых кристаллических структур комплексов 14-3-3 с фрагментами различных белков-партнеров (HSPB6, Gli, STARD1, AANAT, BAD и E6).
5. Выявлена структурная разупорядоченность N-концевой области, которая важна для димеризации 14-3-3. Направленный мутагенез в этой области позволил получить мономерные формы 14-3-3 и впервые установить, что они обладают пониженной стабильностью и, одновременно с этим, повышенной гидрофобностью и повышенной антиагрегационной активностью с некоторыми белками-субстратами.

ПРИЛОЖЕНИЕ

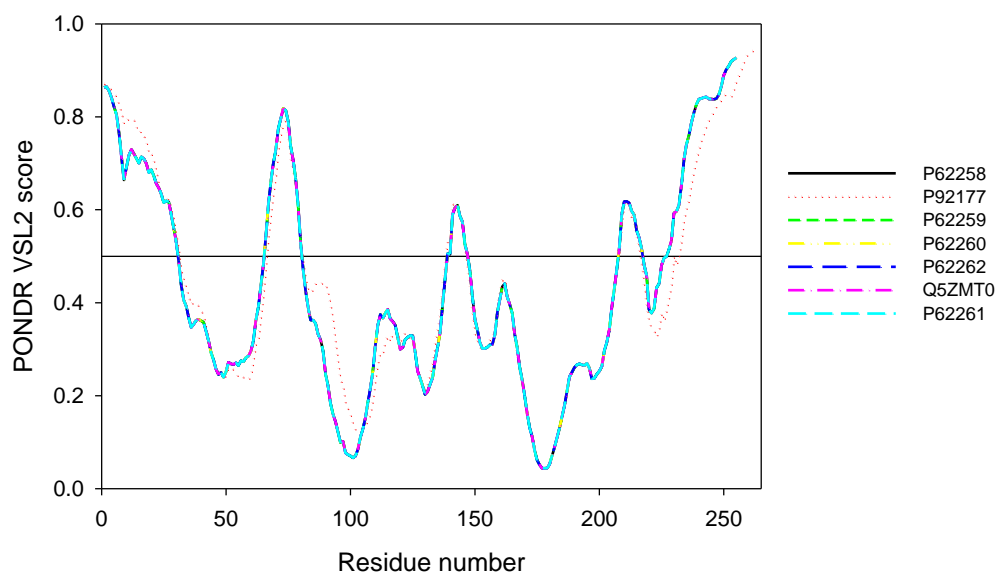
Дополнение 1.

Анализ склонности различных представителей семейства белков 14-3-3 к структурной разупорядоченности (ID) с точностью до аминокислотной позиции (Residue number), по данным предсказания с помощью алгоритма *PONDR VSL2* [432]. Значения *PONDR VSL2 score* выше 0,5 указывают на выраженную склонность к ID, которая может проявляться в отсутствие дополнительных стабилизирующих факторов. Используемые в анализе последовательности указаны в виде идентификаторов в *Uniprot*.

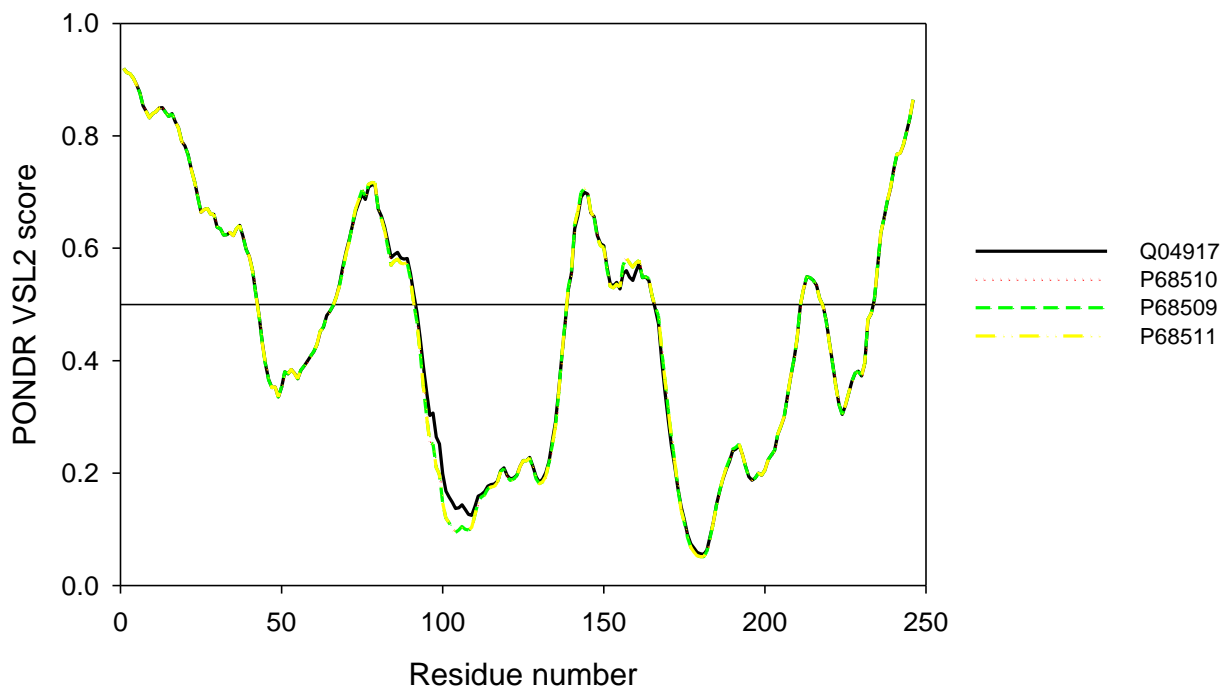
Ортологи 14-3-3β:



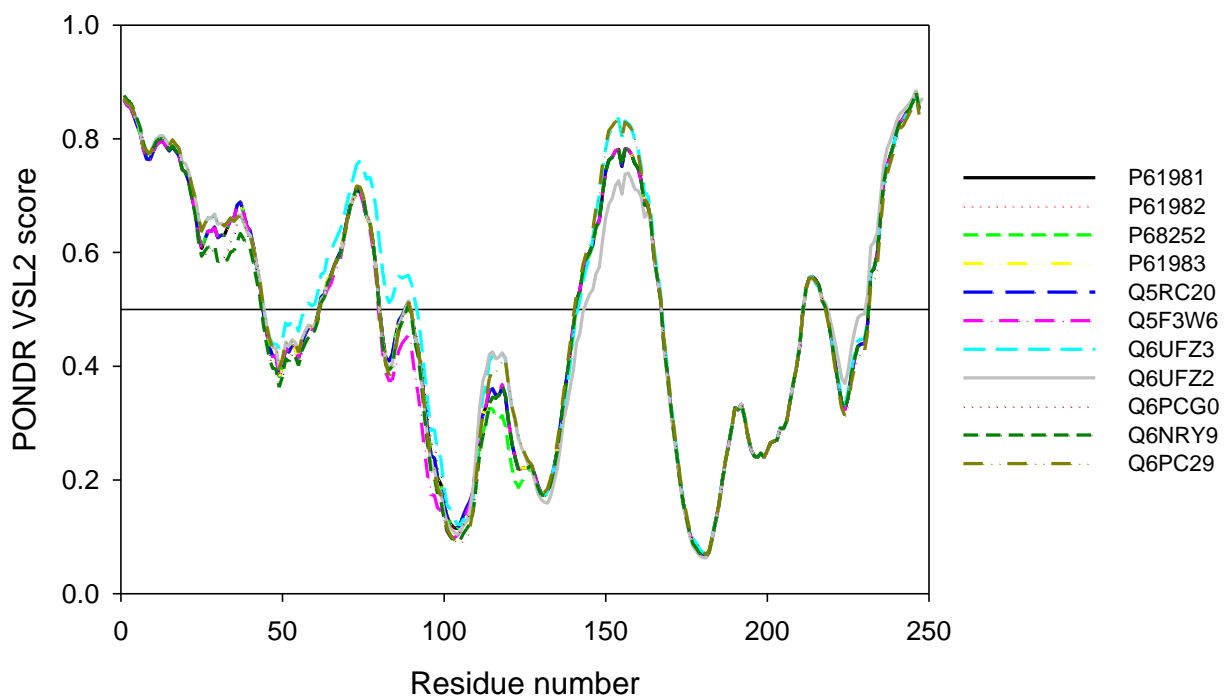
Ортологи 14-3-3ε:



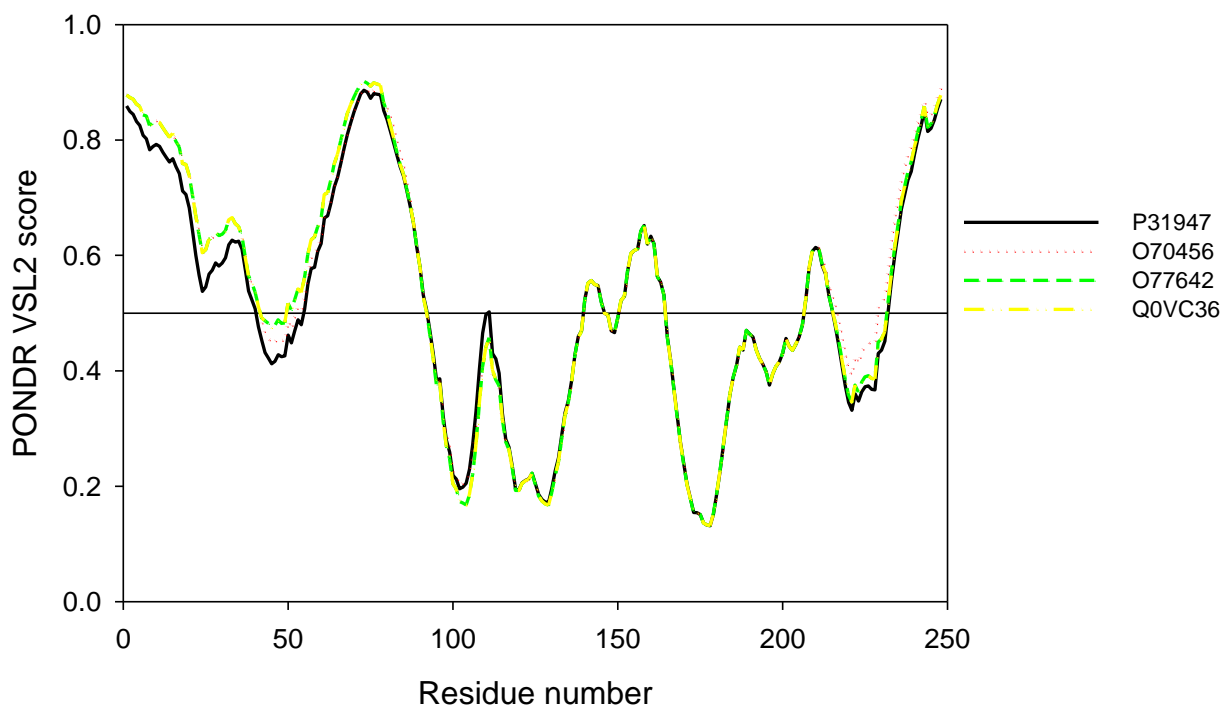
Ортологи 14-3-3η:



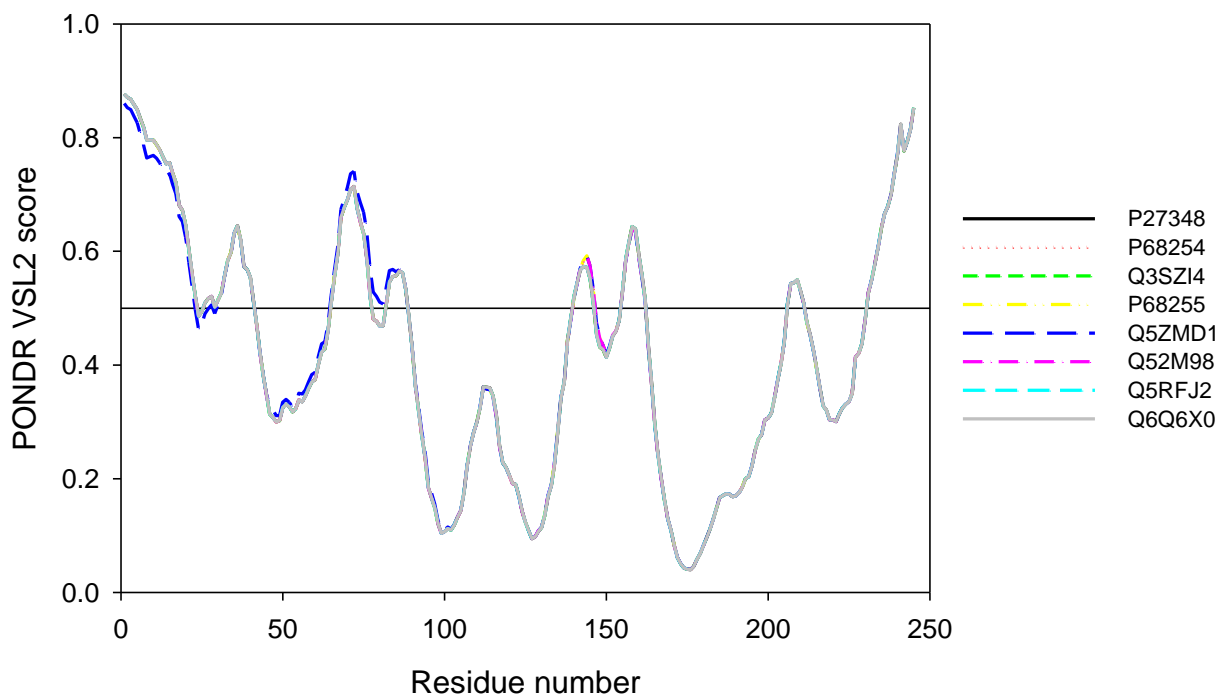
Ортологи 14-3-3γ:



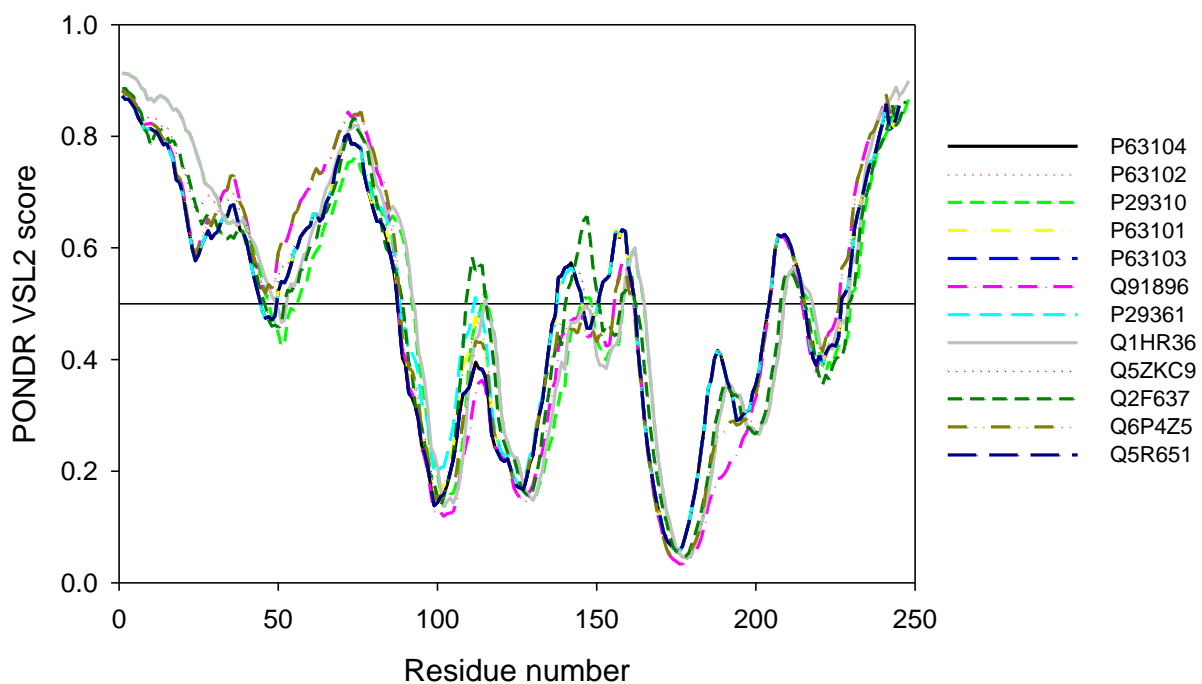
Ортологи 14-3-3σ:



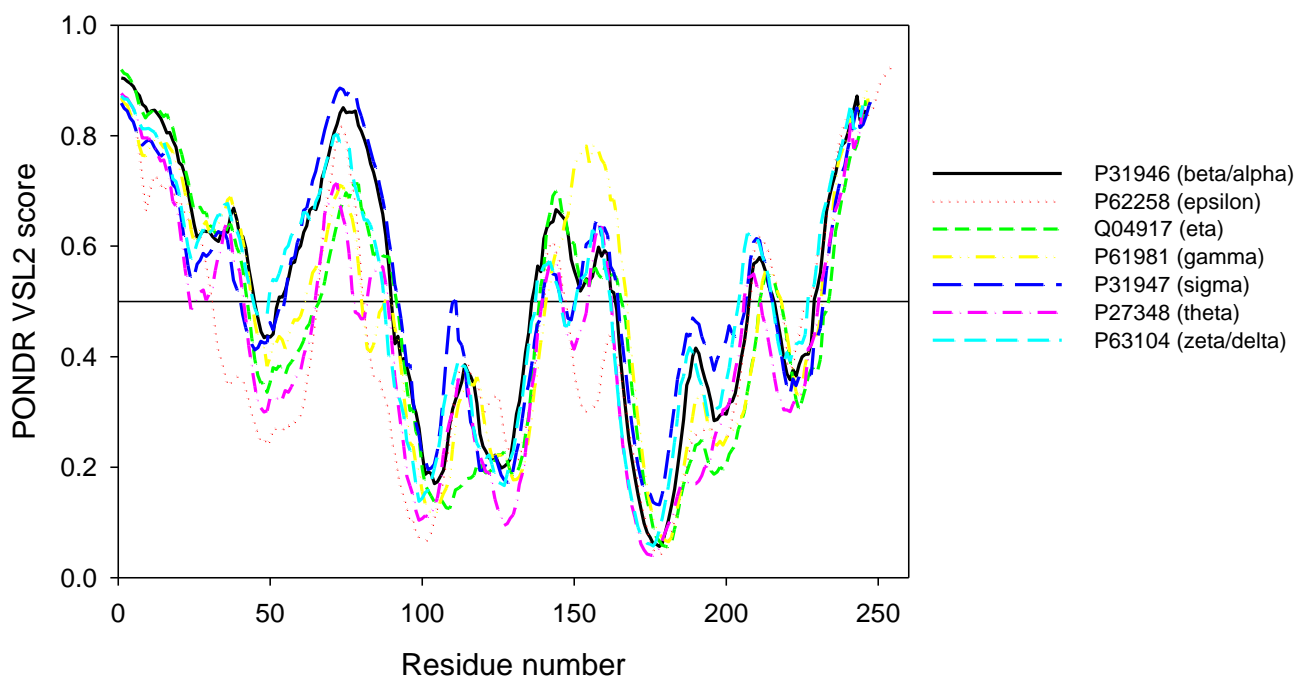
Ортологи 14-3-3τ:



Ортологи 14-3-3ζ:



Данные для всех изоформ 14-3-3 человека:



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Obsil T., Obsilova V. Structural basis of 14-3-3 protein functions // *Semin Cell Dev Biol.* – 2011. – Т. 22, № 7. – С. 663-72.
2. Yano M., Nakamuta S., Wu X., Okumura Y., Kido H. A novel function of 14-3-3 protein: 14-3-3zeta is a heat-shock-related molecular chaperone that dissolves thermal-aggregated proteins // *Mol Biol Cell.* – 2006. – Т. 17, № 11. – С. 4769-79.
3. Stevers L. M., Sijbesma E., Botta M., MacKintosh C., Obsil T., Landrieu I., Cau Y., Wilson A. J., Karawajczyk A., Eickhoff J., Davis J., Hann M., O'Mahony G., Doveston R. G., Brunsveld L., Ottmann C. Modulators of 14-3-3 Protein-Protein Interactions // *J Med Chem.* – 2018. – Т. 61, № 9. – С. 3755-3778.
4. Dreiza C. M., Komalavilas P., Furnish E. J., Flynn C. R., Sheller M. R., Smoke C. C., Lopes L. B., Brophy C. M. The small heat shock protein, HSPB6, in muscle function and disease // *Cell Stress and Chaperones.* – 2009. – Т. 15, № 1. – С. 1-11.
5. Zhang Q. C., Petrey D., Deng L., Qiang L., Shi Y., Thu C. A., Bisikirska B., Lefebvre C., Accili D., Hunter T., Maniatis T., Califano A., Honig B. Structure-based prediction of protein-protein interactions on a genome-wide scale // *Nature.* – 2012. – Т. 490, № 7421. – С. 556-60.
6. Stumpf M. P., Thorne T., de Silva E., Stewart R., An H. J., Lappe M., Wiuf C. Estimating the size of the human interactome // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – Т. 105, № 19. – С. 6959-64.
7. Hu G., Wu Z., Uversky V. N., Kurgan L. Functional Analysis of Human Hub Proteins and Their Interactors Involved in the Intrinsic Disorder-Enriched Interactions // *Int J Mol Sci.* – 2017. – Т. 18, № 12.
8. Kim P. M., Lu L. J., Xia Y., Gerstein M. B. Relating three-dimensional structures to protein networks provides evolutionary insights // *Science.* – 2006. – Т. 314, № 5807. – С. 1938-41.
9. Patil A., Kinoshita K., Nakamura H. Hub promiscuity in protein-protein interaction networks // *Int J Mol Sci.* – 2010. – Т. 11, № 4. – С. 1930-43.
10. Dunker A. K., Cortese M. S., Romero P., Iakoucheva L. M., Uversky V. N. Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks // *FEBS J.* – 2005. – Т. 272, № 20. – С. 5129-48.
11. Reed B. J., Locke M. N., Gardner R. G. A Conserved Deubiquitinating Enzyme Uses Intrinsically Disordered Regions to Scaffold Multiple Protein Interaction Sites // *J Biol Chem.* – 2015. – Т. 290, № 33. – С. 20601-12.

12. Patil A., Kinoshita K., Nakamura H. Domain distribution and intrinsic disorder in hubs in the human protein-protein interaction network // *Protein Sci.* – 2010. – T. 19, № 8. – C. 1461-8.
13. Pawson T. Protein modules and signalling networks // *Nature.* – 1995. – T. 373, № 6515. – C. 573-80.
14. Uversky V. N., Oldfield C. J., Dunker A. K. Showing your ID: intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling // *J Mol Recognit.* – 2005. – T. 18, № 5. – C. 343-84.
15. Uversky V. N., Gillespie J. R., Fink A. L. Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? // *Proteins.* – 2000. – T. 41, № 3. – C. 415-27.
16. Piovesan D., Tabaro F., Micetic I., Necci M., Quaglia F., Oldfield C. J., Aspromonte M. C., Davey N. E., Davidovic R., Dosztanyi Z., Elofsson A., Gasparini A., Hatos A., Kajava A. V., Kalmar L., Leonardi E., Lazar T., Macedo-Ribeiro S., Macossay-Castillo M., Meszaros A., Minervini G., Murvai N., Pujols J., Roche D. B., Salladini E., Schad E., Schramm A., Szabo B., Tantos A., Tonello F., Tsirigos K. D., Veljkovic N., Ventura S., Vranken W., Warholm P., Uversky V. N., Dunker A. K., Longhi S., Tompa P., Tosatto S. C. DisProt 7.0: a major update of the database of disordered proteins // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – T. 45, № D1. – C. D219-D227.
17. Uversky V. N. Introduction to intrinsically disordered proteins (IDPs) // *Chem Rev.* – 2014. – T. 114, № 13. – C. 6557-60.
18. Oldfield C. J., Dunker A. K. Intrinsically disordered proteins and intrinsically disordered protein regions // *Annu Rev Biochem.* – 2014. – T. 83. – C. 553-84.
19. Ward J. J., Sodhi J. S., McGuffin L. J., Buxton B. F., Jones D. T. Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life // *J Mol Biol.* – 2004. – T. 337, № 3. – C. 635-45.
20. Schad E., Tompa P., Hegyi H. The relationship between proteome size, structural disorder and organism complexity // *Genome Biol.* – 2011. – T. 12, № 12. – C. R120.
21. Pancsa R., Tompa P. Structural disorder in eukaryotes // *PLoS One.* – 2012. – T. 7, № 4. – C. e34687.
22. Liu Z., Huang Y. Advantages of proteins being disordered // *Protein Sci.* – 2014. – T. 23, № 5. – C. 539-50.
23. Uversky V. N. The multifaceted roles of intrinsic disorder in protein complexes // *FEBS Lett.* – 2015. – T. 589, № 19 Pt A. – C. 2498-506.

24. Hegyi H., Buday L., Tompa P. Intrinsic structural disorder confers cellular viability on oncogenic fusion proteins // *PLoS Comput Biol.* – 2009. – T. 5, № 10. – C. e1000552.
25. Singh G. P., Ganapathi M., Dash D. Role of intrinsic disorder in transient interactions of hub proteins // *Proteins.* – 2007. – T. 66, № 4. – C. 761-5.
26. Haynes C., Oldfield C. J., Ji F., Klitgord N., Cusick M. E., Radivojac P., Uversky V. N., Vidal M., Iakoucheva L. M. Intrinsic disorder is a common feature of hub proteins from four eukaryotic interactomes // *PLoS Comput Biol.* – 2006. – T. 2, № 8. – C. e100.
27. Lawrence C. W., Kumar S., Noid W. G., Showalter S. A. Role of Ordered Proteins in the Folding-Upon-Binding of Intrinsically Disordered Proteins // *J Phys Chem Lett.* – 2014. – T. 5, № 5. – C. 833-8.
28. Uversky V. N. Intrinsic disorder-based protein interactions and their modulators // *Curr Pharm Des.* – 2013. – T. 19, № 23. – C. 4191-213.
29. Hazy E., Tompa P. Limitations of induced folding in molecular recognition by intrinsically disordered proteins // *Chemphyschem.* – 2009. – T. 10, № 9-10. – C. 1415-9.
30. Darling A. L., Uversky V. N. Intrinsic Disorder and Posttranslational Modifications: The Darker Side of the Biological Dark Matter // *Front Genet.* – 2018. – T. 9. – C. 158.
31. Dunker A. K., Bondos S. E., Huang F., Oldfield C. J. Intrinsically disordered proteins and multicellular organisms // *Semin Cell Dev Biol.* – 2015. – T. 37. – C. 44-55.
32. Iakoucheva L. M., Radivojac P., Brown C. J., O'Connor T. R., Sikes J. G., Obradovic Z., Dunker A. K. The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – T. 32, № 3. – C. 1037-49.
33. Jin J., Pawson T. Modular evolution of phosphorylation-based signalling systems // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 2012. – T. 367, № 1602. – C. 2540-55.
34. Yaffe M. B., Rittinger K., Volinia S., Caron P. R., Aitken A., Leffers H., Gamblin S. J., Smerdon S. J., Cantley L. C. The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity // *Cell.* – 1997. – T. 91, № 7. – C. 961-971.
35. Coblitz B., Wu M., Shikano S., Li M. C-terminal binding: an expanded repertoire and function of 14-3-3 proteins // *FEBS Lett.* – 2006. – T. 580, № 6. – C. 1531-1535.
36. Sudol M., Chen H. I., Bougeret C., Einbond A., Bork P. Characterization of a novel protein-binding module--the WW domain // *FEBS Lett.* – 1995. – T. 369, № 1. – C. 67-71.
37. Yaffe M. B., Elia A. E. Phosphoserine/threonine-binding domains // *Curr Opin Cell Biol.* – 2001. – T. 13, № 2. – C. 131-8.

38. Salah Z., Alian A., Aqeilan R. I. WW domain-containing proteins: retrospectives and the future // *Front Biosci (Landmark Ed)*. – 2012. – T. 17. – C. 331-48.
39. Zhang C., Zhang F. The Multifunctions of WD40 Proteins in Genome Integrity and Cell Cycle Progression // *J Genomics*. – 2015. – T. 3. – C. 40-50.
40. Wall M. A., Coleman D. E., Lee E., Iniguez-Lluhi J. A., Posner B. A., Gilman A. G., Sprang S. R. The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2 // *Cell*. – 1995. – T. 83, № 6. – C. 1047-58.
41. Almawi A. W., Matthews L. A., Guarne A. FHA domains: Phosphopeptide binding and beyond // *Prog Biophys Mol Biol*. – 2017. – T. 127. – C. 105-110.
42. Durocher D., Taylor I. A., Sarbassova D., Haire L. F., Westcott S. L., Jackson S. P., Smerdon S. J., Yaffe M. B. The molecular basis of FHA domain:phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms // *Mol Cell*. – 2000. – T. 6, № 5. – C. 1169-82.
43. Yu X., Chini C. C., He M., Mer G., Chen J. The BRCT domain is a phospho-protein binding domain // *Science*. – 2003. – T. 302, № 5645. – C. 639-42.
44. Rodriguez M. C., Songyang Z. BRCT domains: phosphopeptide binding and signaling modules // *Front Biosci*. – 2008. – T. 13. – C. 5905-15.
45. Wu Q., Jubb H., Blundell T. L. Phosphopeptide interactions with BRCA1 BRCT domains: More than just a motif // *Prog Biophys Mol Biol*. – 2015. – T. 117, № 2-3. – C. 143-148.
46. Smith M. J., Kulkarni S., Pawson T. FF domains of CA150 bind transcription and splicing factors through multiple weak interactions // *Mol Cell Biol*. – 2004. – T. 24, № 21. – C. 9274-85.
47. Bedford M. T., Leder P. The FF domain: a novel motif that often accompanies WW domains // *Trends Biochem Sci*. – 1999. – T. 24, № 7. – C. 264-5.
48. Murphy J. M., Hansen D. F., Wiesner S., Muhandiram D. R., Borg M., Smith M. J., Sicheri F., Kay L. E., Forman-Kay J. D., Pawson T. Structural studies of FF domains of the transcription factor CA150 provide insights into the organization of FF domain tandem arrays // *J Mol Biol*. – 2009. – T. 393, № 2. – C. 409-24.
49. Wu J. W., Hu M., Chai J., Seoane J., Huse M., Li C., Rigotti D. J., Kyin S., Muir T. W., Fairman R., Massague J., Shi Y. Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling // *Mol Cell*. – 2001. – T. 8, № 6. – C. 1277-89.

50. Hayashi H., Abdollah S., Qiu Y., Cai J., Xu Y. Y., Grinnell B. W., Richardson M. A., Topper J. N., Gimbrone M. A., Jr., Wrana J. L., Falb D. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling // *Cell*. – 1997. – T. 89, № 7. – C. 1165-73.
51. Park J. E., Soung N. K., Johmura Y., Kang Y. H., Liao C., Lee K. H., Park C. H., Nicklaus M. C., Lee K. S. Polo-box domain: a versatile mediator of polo-like kinase function // *Cell Mol Life Sci*. – 2010. – T. 67, № 12. – C. 1957-70.
52. Elia A. E., Rellos P., Haire L. F., Chao J. W., Ivins F. J., Hoepker K., Mohammad D., Cantley L. C., Smerdon S. J., Yaffe M. B. The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain // *Cell*. – 2003. – T. 115, № 1. – C. 83-95.
53. Yoneyama M., Suhara W., Fujita T. Control of IRF-3 activation by phosphorylation // *J Interferon Cytokine Res*. – 2002. – T. 22, № 1. – C. 73-6.
54. Suhara W., Yoneyama M., Iwamura T., Yoshimura S., Tamura K., Namiki H., Aimoto S., Fujita T. Analyses of virus-induced homomeric and heteromeric protein associations between IRF-3 and coactivator CBP/p300 // *J Biochem*. – 2000. – T. 128, № 2. – C. 301-7.
55. Takahasi K., Suzuki N. N., Horiuchi M., Mori M., Suhara W., Okabe Y., Fukuhara Y., Terasawa H., Akira S., Fujita T., Inagaki F. X-ray crystal structure of IRF-3 and its functional implications // *Nat Struct Biol*. – 2003. – T. 10, № 11. – C. 922-7.
56. Songyang Z., Shoelson S. E., Chaudhuri M., Gish G., Pawson T., Haser W. G., King F., Roberts T., Ratnofsky S., Lechleider R. J., et al. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences // *Cell*. – 1993. – T. 72, № 5. – C. 767-78.
57. Shoelson S. E. SH2 and PTB domain interactions in tyrosine kinase signal transduction // *Curr Opin Chem Biol*. – 1997. – T. 1, № 2. – C. 227-34.
58. Schlessinger J., Lemmon M. A. SH2 and PTB Domains in Tyrosine Kinase Signaling // *Science Signaling*. – 2003. – T. 2003, № 191. – C. re12-re12.
59. Wagner M. J., Stacey M. M., Liu B. A., Pawson T. Molecular mechanisms of SH2- and PTB-domain-containing proteins in receptor tyrosine kinase signaling // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2013. – T. 5, № 12. – C. a008987.
60. Moore B. W., Perez V. J., Gehring M. Assay and regional distribution of a soluble protein characteristic of the nervous system // *J Neurochem*. – 1968. – T. 15, № 4. – C. 265-72.
61. Ichimura T., Isobe T., Okuyama T., Yamauchi T., Fujisawa H. Brain 14-3-3 protein is an activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase

- in the presence of Ca²⁺, calmodulin-dependent protein kinase II // FEBS Lett. – 1987. – T. 219, № 1. – C. 79-82.
62. Ichimura T., Isobe T., Okuyama T., Takahashi N., Araki K., Kuwano R., Takahashi Y. Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1988. – T. 85, № 19. – C. 7084-7088.
63. Aitken A., Howell S., Jones D., Madrazo J., Patel Y. 14-3-3 alpha and delta are the phosphorylated forms of raf-activating 14-3-3 beta and zeta. In vivo stoichiometric phosphorylation in brain at a Ser-Pro-Glu-Lys MOTIF // J Biol Chem. – 1995. – T. 270, № 11. – C. 5706-5709.
64. Aitken A. 14-3-3 proteins: a historic overview // Semin. Canc. Biol. – 2006. – T. 16, № 3. – C. 162-172.
65. Toker A., Sellers L. A., Amess B., Patel Y., Harris A., Aitken A. Multiple isoforms of a protein kinase C inhibitor (KCIP-1/14-3-3) from sheep brain. Amino acid sequence of phosphorylated forms // European journal of biochemistry / FEBS. – 1992. – T. 206, № 2. – C. 453-461.
66. Aitken A., Ellis C. A., Harris A., Sellers L. A., Toker A. Kinase and neurotransmitters // Nature. – 1990. – T. 344, № 6267. – C. 594.
67. Martens G. J., Piosik P. A., Danen E. H. Evolutionary conservation of the 14-3-3 protein // Biochem Biophys Res Commun. – 1992. – T. 184, № 3. – C. 1456-9.
68. Hirsch S., Aitken A., Bertsch U., Soll J. A plant homologue to mammalian brain 14-3-3 protein and protein kinase C inhibitor // FEBS Lett. – 1992. – T. 296, № 2. – C. 222-4.
69. van Heusden G. P., Wenzel T. J., Lagendijk E. L., de Steensma H. Y., van den Berg J. A. Characterization of the yeast BMH1 gene encoding a putative protein homologous to mammalian protein kinase II activators and protein kinase C inhibitors // FEBS Lett. – 1992. – T. 302, № 2. – C. 145-50.
70. Moorhead G., Douglas P., Morrice N., Scarabel M., Aitken A., MacKintosh C. Phosphorylated nitrate reductase from spinach leaves is inhibited by 14-3-3 proteins and activated by fusicoccin // Curr Biol. – 1996. – T. 6, № 9. – C. 1104-13.
71. Xiao B., Smerdon S. J., Jones D. H., Dodson G. G., Soneji Y., Aitken A., Gamblin S. J. Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways // Nature. – 1995. – T. 376, № 6536. – C. 188-91.
72. Liu D., Bienkowska J., Petosa C., Collier R. J., Fu H., Liddington R. Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein // Nature. – 1995. – T. 376, № 6536. – C. 191-4.

73. Jones D. H., Ley S., Aitken A. Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins // *FEBS Lett.* – 1995. – T. 368, № 1. – C. 55-8.
74. Muslin A. J., Tanner J. W., Allen P. M., Shaw A. S. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine // *Cell.* – 1996. – T. 84, № 6. – C. 889-897.
75. Reinhardt H. C., Yaffe M. B. Phospho-Ser/Thr-binding domains: navigating the cell cycle and DNA damage response // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2013. – T. 14, № 9. – C. 563-80.
76. Mackintosh C. Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes // *Biochem J.* – 2004. – T. 381, № Pt 2. – C. 329-42.
77. Pozuelo Rubio M., Geraghty K. M., Wong B. H., Wood N. T., Campbell D. G., Morrice N., Mackintosh C. 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking // *Biochem J.* – 2004. – T. 379, № Pt 2. – C. 395-408.
78. van Hemert M. J., Steensma H. Y., van Heusden G. P. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis // *Bioessays.* – 2001. – T. 23, № 10. – C. 936-46.
79. Obsilova V., Silhan J., Boura E., Teisinger J., Obsil T. 14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators // *Physiol Res.* – 2008. – T. 57 Suppl 3. – C. S11-21.
80. Sluchanko N. N. Association of Multiple Phosphorylated Proteins with the 14-3-3 Regulatory Hubs: Problems and Perspectives // *J Mol Biol.* – 2018. – T. 430, № 1. – C. 20-26.
81. Johnson C., Crowther S., Stafford M. J., Campbell D. G., Toth R., MacKintosh C. Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites // *Biochem J.* – 2010. – T. 427, № 1. – C. 69-78.
82. Layfield R., Fergusson J., Aitken A., Lowe J., Landon M., Mayer R. J. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease brains contain 14-3-3 proteins // *Neurosci Lett.* – 1996. – T. 209, № 1. – C. 57-60.
83. Waelter S., Boeddrich A., Lurz R., Scherzinger E., Lueder G., Lehrach H., Wanker E. E. Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation // *Mol Biol Cell.* – 2001. – T. 12, № 5. – C. 1393-407.
84. Wakabayashi K., Umahara T., Hirokawa K., Hanyu H., Uchihara T. 14-3-3 protein sigma isoform co-localizes with phosphorylated alpha-synuclein in Lewy bodies and Lewy neurites in patients with Lewy body disease // *Neurosci Lett.* – 2018. – T. 674. – C. 171-175.

85. Shirakashi Y., Kawamoto Y., Tomimoto H., Takahashi R., Ihara M. alpha-Synuclein is colocalized with 14-3-3 and synphilin-1 in A53T transgenic mice // *Acta Neuropathol.* – 2006. – T. 112, № 6. – C. 681-9.
86. Kawamoto Y., Akiguchi I., Nakamura S., Honjyo Y., Shibasaki H., Budka H. 14-3-3 proteins in Lewy bodies in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease brains // *J Neuropathol Exp Neurol.* – 2002. – T. 61, № 3. – C. 245-53.
87. Giasson B. I., Mabon M. E., Duda J. E., Montine T. J., Robertson D., Hurtig H. I., Lee V. M., Trojanowski J. Q. Tau and 14-3-3 in glial cytoplasmic inclusions of multiple system atrophy // *Acta Neuropathol.* – 2003. – T. 106, № 3. – C. 243-50.
88. Tang Y., Wang R., Zhang Y., Lin S., Qiao N., Sun Z., Cheng S., Zhou W. Co-Upregulation of 14-3-3zeta and P-Akt is Associated with Oncogenesis and Recurrence of Hepatocellular Carcinoma // *Cell Physiol Biochem.* – 2018. – T. 45, № 3. – C. 1097-1107.
89. Kim H. J., Sung S. H., Kim C. Y., Bae M. K., Cho M. S., Kim Y. H., Kim S. C., Ju W. 14-3-3zeta Overexpression is Associated with Poor Prognosis in Ovarian Cancer // *Yonsei Med J.* – 2018. – T. 59, № 1. – C. 51-56.
90. Watanabe N., Komatsu S., Ichikawa D., Miyamae M., Ohashi T., Okajima W., Kosuga T., Konishi H., Shiozaki A., Fujiwara H., Okamoto K., Tsuda H., Otsuji E. Overexpression of YWHAZ as an independent prognostic factor in adenocarcinoma of the esophago-gastric junction // *Am J Cancer Res.* – 2016. – T. 6, № 11. – C. 2729-2736.
91. Li Y. L., Liu L., Xiao Y., Zeng T., Zeng C. 14-3-3sigma is an independent prognostic biomarker for gastric cancer and is associated with apoptosis and proliferation in gastric cancer // *Oncol Lett.* – 2015. – T. 9, № 1. – C. 290-294.
92. Raungrut P., Wongkotsila A., Lirdprapamongkol K., Svasti J., Geater S. L., Phuakaoloun M., Suwiwat S., Thongsuksai P. Prognostic significance of 14-3-3gamma overexpression in advanced non-small cell lung cancer // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2014. – T. 15, № 8. – C. 3513-8.
93. Lin H., Jiao X., Yu B., Du J., Xu H., Dong A., Wan C. Clinical significance of serum 14-3-3 beta in patients with hepatocellular carcinoma // *Cancer Biomark.* – 2017. – T. 20, № 2. – C. 143-150.
94. Chen L., Yang B. 14-3-3 sigma is a useful immunohistochemical marker for diagnosing ovarian granulosa cell tumors and steroid cell tumors // *Int J Gynecol Pathol.* – 2013. – T. 32, № 2. – C. 156-62.

95. Aitken A. Functional specificity in 14-3-3 isoform interactions through dimer formation and phosphorylation. Chromosome location of mammalian isoforms and variants // *Plant Mol Biol.* – 2002. – T. 50, № 6. – C. 993-1010.
96. Kockel L., Vorbruggen G., Jackle H., Mlodzik M., Bohmann D. Requirement for *Drosophila* 14-3-3 zeta in Raf-dependent photoreceptor development // *Genes Dev.* – 1997. – T. 11, № 9. – C. 1140-7.
97. Tommerup N., Leffers H. Assignment of the Human Genes Encoding 14-3-3 Eta (YWHAH) to 22q12, 14-3-3 Zeta (YWHAZ) to 2p25.1–p25.2, and 14-3-3 Beta (YWHAB) to 20q13.1 by in Situ Hybridization // *Genomics.* – 1996. – T. 33, № 1. – C. 149-150.
98. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – T. 22, № 22. – C. 4673-80.
99. Perriere G., Gouy M. WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks // *Biochimie.* – 1996. – T. 78, № 5. – C. 364-9.
100. Berg D., Holzmann C., Riess O. 14-3-3 proteins in the nervous system // *Nature reviews. Neuroscience.* – 2003. – T. 4, № 9. – C. 752-762.
101. Boston P. F., Jackson P., Kynoch P. A., Thompson R. J. Purification, properties, and immunohistochemical localisation of human brain 14-3-3 protein // *J Neurochem.* – 1982. – T. 38, № 5. – C. 1466-1474.
102. Shankardas J., Senchyna M., Dimitrijevic S. Presence and distribution of 14-3-3 proteins in human ocular surface tissues // *Molecular vision.* – 2008. – T. 14. – C. 2604-2615.
103. Leffers H., Madsen P., Rasmussen H. H., Honore B., Andersen A. H., Walbum E., Vandekerckhove J., Celis J. E. Molecular cloning and expression of the transformation sensitive epithelial marker stratifin. A member of a protein family that has been involved in the protein kinase C signalling pathway // *J Mol Biol.* – 1993. – T. 231, № 4. – C. 982-98.
104. Martin H., Patel Y., Jones D., Howell S., Robinson K., Aitken A. Antibodies against the major brain isoforms of 14-3-3 protein. An antibody specific for the N-acetylated amino-terminus of a protein // *FEBS Lett.* – 1993. – T. 331, № 3. – C. 296-303.
105. Jones D. H., Martin H., Madrazo J., Robinson K. A., Nielsen P., Roseboom P. H., Patel Y., Howell S. A., Aitken A. Expression and structural analysis of 14-3-3 proteins // *Journal of molecular biology.* – 1995. – T. 245, № 4. – C. 375-384.

106. Benzinger A., Popowicz G., Joy J., Majumdar S., Holak T., Hermeking H. The crystal structure of the non-liganded 14-3-3sigma protein: insights into determinants of isoform specific ligand binding and dimerization // *Cell research*. – 2005. – T. 15, № 4. – C. 219-227.
107. Eisenreichova A., Klima M., Boura E. Crystal structures of a yeast 14-3-3 protein from *Lachancea thermotolerans* in the unliganded form and bound to a human lipid kinase PI4KB-derived peptide reveal high evolutionary conservation // *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. – 2016. – T. 72, № Pt 11. – C. 799-803.
108. Brokx S. J., Wernimont A. K., Dong A., Wasney G. A., Lin Y. H., Lew J., Vedadi M., Lee W. H., Hui R. Characterization of 14-3-3 proteins from *Cryptosporidium parvum* // *PLoS One*. – 2011. – T. 6, № 8. – C. e14827.
109. Saponaro A., Porro A., Chaves-Sanjuan A., Nardini M., Rauh O., Thiel G., Moroni A. Fusaric acid Activates KAT1 Channels by Stabilizing Their Interaction with 14-3-3 Proteins // *Plant Cell*. – 2017. – T. 29, № 10. – C. 2570-2580.
110. Zhu H., Sepulveda E., Hartmann M. D., Kogenaru M., Ursinus A., Sulz E., Albrecht R., Coles M., Martin J., Lupas A. N. Origin of a folded repeat protein from an intrinsically disordered ancestor // *eLife*. – 2016. – T. 5.
111. Athwal G., Huber S. Divalent cations and polyamines bind to loop 8 of 14-3-3 proteins, modulating their interaction with phosphorylated nitrate reductase // *The Plant journal : for cell and molecular biology*. – 2002. – T. 29, № 2. – C. 119-129.
112. Robinson K., Jones D., Patel Y., Martin H., Madrazo J., Martin S., Howell S., Elmore M., Finnen M. J., Aitken A. Mechanism of inhibition of protein kinase C by 14-3-3 isoforms. 14-3-3 isoforms do not have phospholipase A2 activity // *Biochem. J*. – 1994. – T. 299 (Pt 3). – C. 853-861.
113. Gardino A., Smerdon S., Yaffe M. Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: a comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms // *Semin. Canc. Biol*. – 2006. – T. 16, № 3. – C. 173-182.
114. Yang X., Lee W. H., Sobott F., Papagrigoriou E., Robinson C., Grossmann G., Sundström M., Doyle D., Elkins J. Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2006. – T. 103, № 46. – C. 17237-17242.
115. Chaudhri M., Scarabel M., Aitken A. Mammalian and yeast 14-3-3 isoforms form distinct patterns of dimers in vivo // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2003. – T. 300, № 3. – C. 679-85.

116. Verdoodt B., Benzinger A., Popowicz G. M., Holak T. A., Hermeking H. Characterization of 14-3-3sigma dimerization determinants: requirement of homodimerization for inhibition of cell proliferation // *Cell Cycle*. – 2006. – T. 5, № 24. – C. 2920-6.
117. Gu Y.-M., Jin Y.-H., Choi J.-K., Baek K.-H., Yeo C.-Y., Lee K.-Y. Protein kinase A phosphorylates and regulates dimerization of 14-3-3 epsilon // *FEBS Lett.* – 2006. – T. 580, № 1. – C. 305-310.
118. Powell D., Rane M., Joughin B., Kalmukova R., Hong J.-H., Tidor B., Dean W., Pierce W., Klein J., Yaffe M., McLeish K. Proteomic identification of 14-3-3zeta as a mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 substrate: role in dimer formation and ligand binding // *Mol Cell Biol.* – 2003. – T. 23, № 15. – C. 5376-5387.
119. Woodcock J. M., Murphy J., Stomski F. C., Berndt M. C., Lopez A. F. The dimeric versus monomeric status of 14-3-3zeta is controlled by phosphorylation of Ser58 at the dimer interface // *J Biol Chem.* – 2003. – T. 278, № 38. – C. 36323-36327.
120. Gokirmak T., Denison F. C., Laughner B. J., Paul A. L., Ferl R. J. Phosphomimetic mutation of a conserved serine residue in *Arabidopsis thaliana* 14-3-3omega suggests a regulatory role of phosphorylation in dimerization and target interactions // *Plant Physiol Biochem.* – 2015. – T. 97. – C. 296-303.
121. Ashkenazy H., Abadi S., Martz E., Chay O., Mayrose I., Pupko T., Ben-Tal N. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – T. 44, № W1. – C. W344-50.
122. Wilker E., Grant R., Artim S., Yaffe M. A structural basis for 14-3-3sigma functional specificity // *J. Biol. Chem.* – 2005. – T. 280, № 19. – C. 18891-18898.
123. Liang X., Butterworth M., Peters K., Walker W., Frizzell R. An obligatory heterodimer of 14-3-3beta and 14-3-3epsilon is required for aldosterone regulation of the epithelial sodium channel // *The Journal of biological chemistry.* – 2008. – T. 283, № 41. – C. 27418-27425.
124. Alvarez D., Callejo M., Shoucri R., Boyer L., Price G., Zannis-Hadjopoulos M. Analysis of the cruciform binding activity of recombinant 14-3-3zeta-MBP fusion protein, its heterodimerization profile with endogenous 14-3-3 isoforms, and effect on mammalian DNA replication in vitro // *Biochemistry.* – 2003. – T. 42, № 23. – C. 7205-7215.
125. Veisova D., Rezabkova L., Stepanek M., Novotna P., Herman P., Vecer J., Obsil T., Obsilova V. The C-terminal segment of yeast BMH proteins exhibits different structure compared to other 14-3-3 protein isoforms // *Biochemistry.* – 2010. – T. 49, № 18. – C. 3853-61.

126. Punihaole D., Jakubek R. S., Workman R. J., Marbella L. E., Campbell P., Madura J. D., Asher S. A. Monomeric Polyglutamine Structures That Evolve into Fibrils // *J Phys Chem B*. – 2017. – T. 121, № 24. – C. 5953-5967.
127. Zhang Y., Man V. H., Roland C., Sagui C. Amyloid Properties of Asparagine and Glutamine in Prion-like Proteins // *ACS Chem Neurosci*. – 2016. – T. 7, № 5. – C. 576-87.
128. Wear M. P., Kryndushkin D., O'Meally R., Sonnenberg J. L., Cole R. N., Shewmaker F. P. Proteins with Intrinsically Disordered Domains Are Preferentially Recruited to Polyglutamine Aggregates // *PLoS One*. – 2015. – T. 10, № 8. – C. e0136362.
129. Shen W., Clark C., Huber S. The C-terminal tail of Arabidopsis 14-3-3omega functions as an autoinhibitor and may contain a tenth alpha-helix // *The Plant journal : for cell and molecular biology*. – 2003. – T. 34, № 4. – C. 473-484.
130. Silhan J., Obsilova V., Vecer J., Herman P., Sulc M., Teisinger J., Obsil T. 14-3-3 protein C-terminal stretch occupies ligand binding groove and is displaced by phosphopeptide binding // *J Biol Chem*. – 2004. – T. 279, № 47. – C. 49113-9.
131. Williams D. M., Ecroyd H., Goodwin K. L., Dai H., Fu H., Woodcock J. M., Zhang L., Carver J. A. NMR spectroscopy of 14-3-3zeta reveals a flexible C-terminal extension: differentiation of the chaperone and phosphoserine-binding activities of 14-3-3zeta // *Biochem J*. – 2011. – T. 437, № 3. – C. 493-503.
132. Chernik I., Seit-Nebi A., Marston S., Gusev N. Small heat shock protein Hsp20 (HspB6) as a partner of 14-3-3gamma // *Mol Cell Biochem*. – 2007. – T. 295, № 1-2. – C. 9-17.
133. Sluchanko N. N., Gusev N. B. Moonlighting chaperone-like activity of the universal regulatory 14-3-3 proteins // *FEBS J*. – 2017. – T. 284, № 9. – C. 1279-1295.
134. Sluchanko N. N., Artemova N. V., Sudnitsyna M. V., Safenkova I. V., Antson A. A., Levitsky D. I., Gusev N. B. Monomeric 14-3-3zeta has a chaperone-like activity and is stabilized by phosphorylated HspB6 // *Biochemistry*. – 2012. – T. 51, № 31. – C. 6127-38.
135. Sluchanko N. N., Roman S. G., Chebotareva N. A., Gusev N. B. Chaperone-like activity of monomeric human 14-3-3zeta on different protein substrates // *Arch Biochem Biophys*. – 2014. – T. 549. – C. 32-9.
136. Rittinger K., Budman J., Xu J., Volinia S., Cantley L. C., Smerdon S. J., Gamblin S. J., Yaffe M. B. Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding // *Mol. Cell*. – 1999. – T. 4, № 2. – C. 153-166.

137. Mackintosh C. Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes // *Biochem J.* – 2004. – T. 381, № 2. – C. 329-342.
138. Ganguly S., Weller J., Ho A., Chemineau P., Malpoux B., Klein D. Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205 // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2005. – T. 102, № 4. – C. 1222-1227.
139. Hallberg B. Exoenzyme S binds its cofactor 14-3-3 through a non-phosphorylated motif // *Biochem Soc Trans.* – 2002. – T. 30, № 4. – C. 401-5.
140. Yasmin L., Jansson A., Panahandeh T., Palmer R., Francis M., Hallberg B. Delineation of exoenzyme S residues that mediate the interaction with 14-3-3 and its biological activity // *FEBS J.* – 2006. – T. 273, № 3. – C. 638-646.
141. Wang B., Yang H., Liu Y. C., Jelinek T., Zhang L., Ruoslahti E., Fu H. Isolation of high-affinity peptide antagonists of 14-3-3 proteins by phage display // *Biochemistry.* – 1999. – T. 38, № 38. – C. 12499-504.
142. Zhang L., Wang H., Liu D., Liddington R., Fu H. Raf-1 kinase and exoenzyme S interact with 14-3-3zeta through a common site involving lysine 49 // *The Journal of biological chemistry.* – 1997. – T. 272, № 21. – C. 13717-13724.
143. Petosa C., Masters S. C., Bankston L. A., Pohl J., Wang B., Fu H., Liddington R. C. 14-3-3zeta binds a phosphorylated Raf peptide and an unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove // *J Biol Chem.* – 1998. – T. 273, № 26. – C. 16305-10.
144. Stevers L. M., de Vries R. M., Doveston R. G., Milroy L. G., Brunsveld L., Ottmann C. Structural interface between LRRK2 and 14-3-3 protein // *Biochem J.* – 2017. – T. 474, № 7. – C. 1273-1287.
145. Sluchanko N. N., Beelen S., Kulikova A. A., Weeks S. D., Antson A. A., Gusev N. B., 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. – T. 25, № 2. – C. 305-316.
146. Wurtele M., Jelich-Ottmann C., Wittinghofer A., Oecking C. Structural view of a fungal toxin acting on a 14-3-3 regulatory complex // *EMBO J.* – 2003. – T. 22, № 5. – C. 987-94.
147. Xu C., Jin J., Bian C., Lam R., Tian R., Weist R., You L., Nie J., Bochkarev A., Tempel W., Tan C. S., Wasney G. A., Vedadi M., Gish G. D., Arrowsmith C. H., Pawson T., Yang X. J., Min J. Sequence-Specific Recognition of a PxLPxI/L Motif by an Ankyrin Repeat Tumbler Lock // *Science Signaling.* – 2012. – T. 5, № 226. – C. ra39-ra39.

148. Schumacher B., Mondry J., Thiel P., Weyand M., Ottmann C. Structure of the p53 C-terminus bound to 14-3-3: implications for stabilization of the p53 tetramer // *FEBS Lett.* – 2010. – T. 584, № 8. – C. 1443-8.
149. Molzan M., Ottmann C. Synergistic binding of the phosphorylated S233- and S259-binding sites of C-RAF to one 14-3-3zeta dimer // *J Mol Biol.* – 2012. – T. 423, № 4. – C. 486-95.
150. Killoran R. C., Fan J., Yang D., Shilton B. H., Choy W. Y. Structural Analysis of the 14-3-3zeta/Chibby Interaction Involved in Wnt/beta-Catenin Signaling // *PLoS One.* – 2015. – T. 10, № 4. – C. e0123934.
151. Bonet R., Vakonakis I., Campbell I. D. Characterization of 14-3-3-zeta Interactions with integrin tails // *J Mol Biol.* – 2013. – T. 425, № 17. – C. 3060-72.
152. Rose R., Rose M., Ottmann C. Identification and structural characterization of two 14-3-3 binding sites in the human peptidylarginine deiminase type VI // *J Struct Biol.* – 2012. – T. 180, № 1. – C. 65-72.
153. Madeira F., Tinti M., Murugesan G., Berrett E., Stafford M., Toth R., Cole C., MacKintosh C., Barton G. J. 14-3-3-Pred: improved methods to predict 14-3-3-binding phosphopeptides // *Bioinformatics.* – 2015. – T. 31, № 14. – C. 2276-83.
154. Yaffe M. How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis // *FEBS Lett.* – 2002. – T. 513, № 1. – C. 53-57.
155. Dougherty M., Morrison D. Unlocking the code of 14-3-3 // *Journal of cell science.* – 2004. – T. 117, № Pt 10. – C. 1875-1884.
156. Waterman M. J., Stavridi E. S., Waterman J. L., Halazonetis T. D. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins // *Nat Genet.* – 1998. – T. 19, № 2. – C. 175-8.
157. Manschwetus J. T., Wallbott M., Fachinger A., Obergruber C., Pautz S., Bertinetti D., Schmidt S. H., Herberg F. W. Binding of the Human 14-3-3 Isoforms to Distinct Sites in the Leucine-Rich Repeat Kinase 2 // *Front Neurosci.* – 2020. – T. 14. – C. 302.
158. Kosteletzky B., Saurin A., Purkiss A., Parker P., McDonald N. Recognition of an intra-chain tandem 14-3-3 binding site within PKCepsilon // *EMBO reports.* – 2009. – T. 10, № 9. – C. 983-989.
159. Obsil T., Ghirlando R., Anderson D. E., Hickman A. B., Dyda F. Two 14-3-3 binding motifs are required for stable association of Forkhead transcription factor FOXO4 with 14-3-3 proteins and inhibition of DNA binding // *Biochemistry.* – 2003. – T. 42, № 51. – C. 15264-72.

160. Romero P., Obradovic Z., Li X., Garner E. C., Brown C. J., Dunker A. K. Sequence complexity of disordered protein // *Proteins*. – 2001. – T. 42, № 1. – C. 38-48.
161. Bustos D. M., Iglesias A. A. Intrinsic disorder is a key characteristic in partners that bind 14-3-3 proteins // *Proteins*. – 2006. – T. 63, № 1. – C. 35-42.
162. Bartel M., Schafer A., Stevers L. M., Ottmann C. Small molecules, peptides and natural products: getting a grip on 14-3-3 protein-protein modulation // *Future Med Chem*. – 2014. – T. 6, № 8. – C. 903-21.
163. Obsil T., Ghirlando R., Klein D. C., Ganguly S., Dyda F. Crystal structure of the 14-3-3zeta:serotonin N-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation // *Cell*. – 2001. – T. 105, № 2. – C. 257-267.
164. Lizcano J. M., Morrice N., Cohen P. Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155 // *Biochem J*. – 2000. – T. 349, № Pt 2. – C. 547-57.
165. Chen S., Murphy J., Toth R., Campbell D. G., Morrice N. A., Mackintosh C. Complementary regulation of TBC1D1 and AS160 by growth factors, insulin and AMPK activators // *Biochem J*. – 2008. – T. 409, № 2. – C. 449-59.
166. Geraghty K. M., Chen S., Harthill J. E., Ibrahim A. F., Toth R., Morrice N. A., Vandermoere F., Moorhead G. B., Hardie D. G., MacKintosh C. Regulation of multisite phosphorylation and 14-3-3 binding of AS160 in response to IGF-1, EGF, PMA and AICAR // *Biochem J*. – 2007. – T. 407, № 2. – C. 231-41.
167. Sluchanko N. N., Seit-Nebi A. S., Gusev N. B. Phosphorylation of more than one site is required for tight interaction of human tau protein with 14-3-3zeta // *FEBS Lett*. – 2009. – T. 583, № 17. – C. 2739-42.
168. Tugaeva K. V., Tsvetkov P. O., Sluchanko N. N. Bacterial co-expression of human Tau protein with protein kinase A and 14-3-3 for studies of 14-3-3/phospho-Tau interaction // *PLoS One*. – 2017. – T. 12, № 6. – C. e0178933.
169. Stevers L. M., Lam C. V., Leysen S. F., Meijer F. A., van Scheppingen D. S., de Vries R. M., Carlile G. W., Milroy L. G., Thomas D. Y., Brunsveld L., Ottmann C. Characterization and small-molecule stabilization of the multisite tandem binding between 14-3-3 and the R domain of CFTR // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2016. – T. 113, № 9. – C. E1152-61.
170. Ottmann C., Marco S., Jaspert N., Marcon C., Schauer N., Weyand M., Vandermeeren C., Duby G., Boutry M., Wittinghofer A., Rigaud J. L., Oecking C. Structure of a 14-3-3

- coordinated hexamer of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by combining X-ray crystallography and electron cryomicroscopy // *Mol Cell*. – 2007. – T. 25, № 3. – C. 427-40.
171. Kanczewska J., Marco S., Vandermeeren C., Maudoux O., Rigaud J. L., Boutry M. Activation of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins converts a dimer into a hexamer // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2005. – T. 102, № 33. – C. 11675-80.
172. Sluchanko N. N. Reading the phosphorylation code: binding of the 14-3-3 protein to multivalent client phosphoproteins // *Biochem J*. – 2020. – T. 477, № 7. – C. 1219-1225.
173. Ramteke M. P., Shelke P., Ramamoorthy V., Somavarapu A. K., Gautam A. K., Nanaware P. P., Karanam S., Mukhopadhyay S., Venkatraman P. Identification of a novel ATPase activity in 14-3-3 proteins--evidence from enzyme kinetics, structure guided modeling and mutagenesis studies // *FEBS Lett*. – 2014. – T. 588, № 1. – C. 71-8.
174. Brazda V., Cechova J., Coufal J., Rumpel S., Jagelska E. B. Superhelical DNA as a preferential binding target of 14-3-3gamma protein // *J Biomol Struct Dyn*. – 2012. – T. 30, № 4. – C. 371-8.
175. Todd A., Cossons N., Aitken A., Price G. B., Zannis-Hadjopoulos M. Human cruciform binding protein belongs to the 14-3-3 family // *Biochemistry*. – 1998. – T. 37, № 40. – C. 14317-14325.
176. Alvarez D., Novac O., Callejo M., Ruiz M., Price G., Zannis-Hadjopoulos M. 14-3-3sigma is a cruciform DNA binding protein and associates in vivo with origins of DNA replication // *Journal of cellular biochemistry*. – 2002. – T. 87, № 2. – C. 194-207.
177. Zannis-Hadjopoulos M., Yahyaoui W., Callejo M. 14-3-3 cruciform-binding proteins as regulators of eukaryotic DNA replication // *Trends in biochemical sciences*. – 2008. – T. 33, № 1. – C. 44-50.
178. Toleman C. A., Schumacher M. A., Yu S. H., Zeng W., Cox N. J., Smith T. J., Soderblom E. J., Wands A. M., Kohler J. J., Boyce M. Structural basis of O-GlcNAc recognition by mammalian 14-3-3 proteins // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2018. – T. 115, № 23. – C. 5956-5961.
179. Komiya T., Mihara K. Protein import into mammalian mitochondria. Characterization of the intermediates along the import pathway of the precursor into the matrix // *J Biol Chem*. – 1996. – T. 271, № 36. – C. 22105-10.

180. Alam R., Hachiya N., Sakaguchi M., Kawabata S., Iwanaga S., Kitajima M., Mihara K., Omura T. cDNA cloning and characterization of mitochondrial import stimulation factor (MSF) purified from rat liver cytosol // *J Biochem.* – 1994. – T. 116, № 2. – C. 416-25.
181. Komiya T., Hachiya N., Sakaguchi M., Omura T., Mihara K. Recognition of mitochondria-targeting signals by a cytosolic import stimulation factor, MSF // *J Biol Chem.* – 1994. – T. 269, № 49. – C. 30893-7.
182. Hachiya N., Komiya T., Alam R., Iwahashi J., Sakaguchi M., Omura T., Mihara K. MSF, a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria // *EMBO J.* – 1994. – T. 13, № 21. – C. 5146-54.
183. Vincenz C., Dixit V. M. 14-3-3 proteins associate with A20 in an isoform-specific manner and function both as chaperone and adapter molecules // *J Biol Chem.* – 1996. – T. 271, № 33. – C. 20029-34.
184. Hernandez F., Cuadros R., Avila J. Zeta 14-3-3 protein favours the formation of human tau fibrillar polymers // *Neurosci Lett.* – 2004. – T. 357, № 2. – C. 143-6.
185. Sluchanko N. N., Gusev N. B. Probable participation of 14-3-3 in tau protein oligomerization and aggregation // *J Alzheimers Dis.* – 2011. – T. 27, № 3. – C. 467-76.
186. Sadik G., Tanaka T., Kato K., Yanagi K., Kudo T., Takeda M. Differential interaction and aggregation of 3-repeat and 4-repeat tau isoforms with 14-3-3zeta protein // *Biochemical and biophysical research communications.* – 2009. – T. 383, № 1. – C. 37-41.
187. Han J., Song Q. Q., Sun P., Zhang J., Wang X., Song J., Li G. Q., Liu Y. H., Mei G. Y., Shi Q., Tian C., Chen C., Gao C., Zhao B., Dong X. P. Interaction between 14-3-3beta and PrP influences the dimerization of 14-3-3 and fibrillization of PrP106-126 // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2014. – T. 47. – C. 20-8.
188. Omi K., Hachiya N. S., Tanaka M., Tokunaga K., Kaneko K. 14-3-3zeta is indispensable for aggregate formation of polyglutamine-expanded huntingtin protein // *Neurosci Lett.* – 2008. – T. 431, № 1. – C. 45-50.
189. Chen H. K., Fernandez-Funez P., Acevedo S. F., Lam Y. C., Kaytor M. D., Fernandez M. H., Aitken A., Skoulakis E. M., Orr H. T., Botas J., Zoghbi H. Y. Interaction of Akt-phosphorylated ataxin-1 with 14-3-3 mediates neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 1 // *Cell.* – 2003. – T. 113, № 4. – C. 457-68.
190. Sato S., Chiba T., Sakata E., Kato K., Mizuno Y., Hattori N., Tanaka K. 14-3-3zeta is a novel regulator of parkin ubiquitin ligase // *EMBO J.* – 2006. – T. 25, № 1. – C. 211-21.

191. Plotegher N., Kumar D., Tessari I., Brucale M., Munari F., Tosatto L., Belluzzi E., Greggio E., Bisaglia M., Capaldi S., Aioanei D., Mammi S., Monaco H. L., Samo B., Bubacco L. The chaperone-like protein 14-3-3eta interacts with human alpha-synuclein aggregation intermediates rerouting the amyloidogenic pathway and reducing alpha-synuclein cellular toxicity // *Hum Mol Genet.* – 2014. – T. 23, № 21. – C. 5615-29.
192. Xu Z., Graham K., Foote M., Liang F., Rizkallah R., Hurt M., Wang Y., Wu Y., Zhou Y. 14-3-3 protein targets misfolded chaperone-associated proteins to aggresomes // *J Cell Sci.* – 2013. – T. 126, № Pt 18. – C. 4173-86.
193. Fellerer C., Schweiger R., Schongrubler K., Soll J., Schwenkert S. Cytosolic HSP90 cochaperones HOP and FKBP interact with freshly synthesized chloroplast preproteins of *Arabidopsis* // *Mol Plant.* – 2011. – T. 4, № 6. – C. 1133-45.
194. Hachiya N., Alam R., Sakasegawa Y., Sakaguchi M., Mihara K., Omura T. A mitochondrial import factor purified from rat liver cytosol is an ATP-dependent conformational modulator for precursor proteins // *EMBO J.* – 1993. – T. 12, № 4. – C. 1579-86.
195. Trcka F., Durech M., Vankova P., Vandova V., Simoncik O., Kavan D., Vojtesek B., Muller P., Man P. The interaction of the mitochondrial protein importer TOMM34 with HSP70 is regulated by TOMM34 phosphorylation and binding to 14-3-3 adaptors // *Journal of Biological Chemistry.* – 2020. – T. 295, № 27. – C. 8928-8944.
196. Ahn J., Won M., Choi J. H., Kyun M. L., Cho H. S., Park H. M., Kang C. M., Chung K. S. Small heat-shock protein Hsp9 has dual functions in stress adaptation and stress-induced G2-M checkpoint regulation via Cdc25 inactivation in *Schizosaccharomyces pombe* // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2012. – T. 417, № 1. – C. 613-8.
197. Hubscher V., Mudholkar K., Chiabudini M., Fitzke E., Wolfle T., Pfeifer D., Drepper F., Warscheid B., Rospert S. The Hsp70 homolog Ssb and the 14-3-3 protein Bmh1 jointly regulate transcription of glucose repressed genes in *Saccharomyces cerevisiae* // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – T. 44, № 12. – C. 5629-45.
198. Huang X. Y., Ke A. W., Shi G. M., Zhang X., Zhang C., Shi Y. H., Wang X. Y., Ding Z. B., Xiao Y. S., Yan J., Qiu S. J., Fan J., Zhou J. alphaB-crystallin complexes with 14-3-3zeta to induce epithelial-mesenchymal transition and resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma // *Hepatology.* – 2013. – T. 57, № 6. – C. 2235-47.
199. Sluchanko N. N., Sudnitsyna M. V., Seit-Nebi A. S., Antson A. A., Gusev N. B. Properties of the monomeric form of human 14-3-3zeta protein and its interaction with tau and HspB6 // *Biochemistry.* – 2011. – T. 50, № 45. – C. 9797-808.

200. Fu H., Subramanian R. R., Masters S. C. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* – 2000. – T. 40. – C. 617-47.
201. Nomura M., Shimizu S., Sugiyama T., Narita M., Ito T., Matsuda H., Tsujimoto Y. 14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax // *J Biol Chem.* – 2003. – T. 278, № 3. – C. 2058-65.
202. Won J., Kim D. Y., La M., Kim D., Meadows G. G., Joe C. O. Cleavage of 14-3-3 protein by caspase-3 facilitates bad interaction with Bcl-x(L) during apoptosis // *J Biol Chem.* – 2003. – T. 278, № 21. – C. 19347-19351.
203. Ross D. T., Scherf U., Eisen M. B., Perou C. M., Rees C., Spellman P., Iyer V., Jeffrey S. S., Van de Rijn M., Waltham M., Pergamenschikov A., Lee J. C., Lashkari D., Shalon D., Myers T. G., Weinstein J. N., Botstein D., Brown P. O. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines // *Nat Genet.* – 2000. – T. 24, № 3. – C. 227-35.
204. Boutros R., Bailey A., Wilson S., Byrne J. Alternative splicing as a mechanism for regulating 14-3-3 binding: interactions between hD53 (TPD52L1) and 14-3-3 proteins // *Journal of molecular biology.* – 2003. – T. 332, № 3. – C. 675-687.
205. Tzivion G., Luo Z. J., Avruch J. Calyculin A-induced vimentin phosphorylation sequesters 14-3-3 and displaces other 14-3-3 partners in vivo // *J Biol Chem.* – 2000. – T. 275, № 38. – C. 29772-8.
206. Ku N. O., Michie S., Resurreccion E. Z., Broome R. L., Omary M. B. Keratin binding to 14-3-3 proteins modulates keratin filaments and hepatocyte mitotic progression // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002. – T. 99, № 7. – C. 4373-8.
207. Tzivion G., Gupta V. S., Kaplun L., Balan V. 14-3-3 proteins as potential oncogenes // *Semin Cancer Biol.* – 2006. – T. 16, № 3. – C. 203-13.
208. Choudhary C., Kumar C., Gnad F., Nielsen M. L., Rehman M., Walther T. C., Olsen J. V., Mann M. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions // *Science.* – 2009. – T. 325, № 5942. – C. 834-40.
209. Megidish T., Cooper J., Zhang L., Fu H., Hakomori S. A novel sphingosine-dependent protein kinase (SDK1) specifically phosphorylates certain isoforms of 14-3-3 protein // *J Biol Chem.* – 1998. – T. 273, № 34. – C. 21834-21845.
210. Ma Y., Pitson S., Hercus T., Murphy J., Lopez A., Woodcock J. Sphingosine activates protein kinase A type II by a novel cAMP-independent mechanism // *The Journal of biological chemistry.* – 2005. – T. 280, № 28. – C. 26011-26017.

211. Powell D., Rane M., Chen Q., Singh S., McLeish K. Identification of 14-3-3zeta as a protein kinase B/Akt substrate // *J Biol Chem.* – 2002. – T. 277, № 24. – C. 21639-21642.
212. Tsuruta F., Sunayama J., Mori Y., Hattori S., Shimizu S., Tsujimoto Y., Yoshioka K., Masuyama N., Gotoh Y. JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins // *The EMBO journal.* – 2004. – T. 23, № 8. – C. 1889-1899.
213. Clokie S., Cheung K., Mackie S., Marquez R., Peden A., Aitken A. BCR kinase phosphorylates 14-3-3 Tau on residue 233 // *The FEBS journal.* – 2005. – T. 272, № 15. – C. 3767-3776.
214. Dubois T., Rommel C., Howell S., Steinhussen U., Soneji Y., Morrice N., Moelling K., Aitken A. 14-3-3 is phosphorylated by casein kinase I on residue 233. Phosphorylation at this site in vivo regulates Raf/14-3-3 interaction // *J Biol Chem.* – 1997. – T. 272, № 46. – C. 28882-28888.
215. Civiero L., Cogo S., Kiekens A., Morganti C., Tessari I., Lobbestael E., Baekelandt V., Taymans J. M., Chartier-Harlin M. C., Franchin C., Arrigoni G., Lewis P. A., Piccoli G., Bubacco L., Cookson M. R., Pinton P., Greggio E. PAK6 Phosphorylates 14-3-3gamma to Regulate Steady State Phosphorylation of LRRK2 // *Front Mol Neurosci.* – 2017. – T. 10. – C. 417.
216. Denison F. C., Gökirmak T., Ferl R. J. Phosphorylation-related modification at the dimer interface of 14-3-3 ω dramatically alters monomer interaction dynamics // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* – 2014. – T. 541. – C. 1-12.
217. Sluchanko N. N., Chernik I. S., Seit-Nebi A. S., Pivovarova A. V., Levitsky D. I., Gusev N. B. Effect of mutations mimicking phosphorylation on the structure and properties of human 14-3-3zeta // *Arch Biochem Biophys.* – 2008. – T. 477, № 2. – C. 305-12.
218. Gerst F., Kaiser G., Panse M., Sartorius T., Pujol A., Hennige A. M., Machicao F., Lammers R., Bosch F., Haring H. U., Ullrich S. Protein kinase Cdelta regulates nuclear export of FOXO1 through phosphorylation of the chaperone 14-3-3zeta // *Diabetologia.* – 2015. – T. 58, № 12. – C. 2819-31.
219. Zhou J., Shao Z., Kerkela R., Ichijo H., Muslin A., Pombo C., Force T. Serine 58 of 14-3-3zeta is a molecular switch regulating ASK1 and oxidant stress-induced cell death // *Mol Cell Biol.* – 2009. – T. 29, № 15. – C. 4167-4176.
220. Ahmed K. M., Fan M., Nantajit D., Cao N., Li J. J. Cyclin D1 in low-dose radiation-induced adaptive resistance // *Oncogene.* – 2008. – T. 27, № 53. – C. 6738-6748.

221. Sunayama J., Tsuruta F., Masuyama N., Gotoh Y. JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3 // *J Cell Biol.* – 2005. – T. 170, № 2. – C. 295-304.
222. Silhan J., Obsilova V., Vecer J., Herman P., Sulc M., Teisinger J., Obsil T. 14-3-3 protein C-terminal stretch occupies ligand binding groove and is displaced by phosphopeptide binding // *The Journal of biological chemistry.* – 2004. – T. 279, № 47. – C. 49113-49119.
223. Obsilova V., Herman P., Vecer J., Sulc M., Teisinger J., Obsil T. 14-3-3zeta C-terminal stretch changes its conformation upon ligand binding and phosphorylation at Thr232 // *J. Biol. Chem.* – 2004. – T. 279, № 6. – C. 4531-4540.
224. Datta S. R., Katsov A., Hu L., Petros A., Fesik S. W., Yaffe M. B., Greenberg M. E. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation // *Molecular cell.* – 2000. – T. 6, № 1. – C. 41-51.
225. Yoshida K., Yamaguchi T., Natsume T., Kufe D., Miki Y. JNK phosphorylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage // *Nat Cell Biol.* – 2005. – T. 7, № 3. – C. 278-85.
226. Kalabova D., Smidova A., Petrvalska O., Alblova M., Kosek D., Man P., Obsil T., Obsilova V. Human procaspase-2 phosphorylation at both S139 and S164 is required for 14-3-3 binding // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2017. – T. 493, № 2. – C. 940-945.
227. Cahill C. M., Tzivion G., Nasrin N., Ogg S., Dore J., Ruvkun G., Alexander-Bridges M. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling inhibits DAF-16 DNA binding and function via 14-3-3-dependent and 14-3-3-independent pathways // *J Biol Chem.* – 2001. – T. 276, № 16. – C. 13402-10.
228. Asaoka Y., Kanai F., Ichimura T., Tateishi K., Tanaka Y., Ohta M., Seto M., Tada M., Ijichi H., Ikenoue T., Kawabe T., Isobe T., Yaffe M. B., Omata M. Identification of a suppressive mechanism for Hedgehog signaling through a novel interaction of Gli with 14-3-3 // *J Biol Chem.* – 2010. – T. 285, № 6. – C. 4185-94.
229. Grozinger C. M., Schreiber S. L. Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2000. – T. 97, № 14. – C. 7835-40.
230. Mortenson J. B., Heppler L. N., Banks C. J., Weerasekara V. K., Whited M. D., Piccolo S. R., Johnson W. E., Thompson J. W., Andersen J. L. Histone deacetylase 6 (HDAC6) promotes the pro-survival activity of 14-3-3zeta via deacetylation of lysines within the 14-3-3zeta binding pocket // *J Biol Chem.* – 2015. – T. 290, № 20. – C. 12487-96.

231. Mills V., Baldin V., Goubin F., Pinta I., Papin C., Waye M., Eychene A., Ducommun B. Specific interaction between 14-3-3 isoforms and the human CDC25B phosphatase // *Oncogene*. – 2000. – T. 19, № 10. – C. 1257-65.
232. Wang Y., Jacobs C., Hook K. E., Duan H., Booher R. N., Sun Y. Binding of 14-3-3beta to the carboxyl terminus of Wee1 increases Wee1 stability, kinase activity, and G2-M cell population // *Cell Growth Differ.* – 2000. – T. 11, № 4. – C. 211-9.
233. Tzivion G., Luo Z., Avruch J. A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity // *Nature*. – 1998. – T. 394, № 6688. – C. 88-92.
234. Xing H., Kornfeld K., Muslin A. J. The protein kinase KSR interacts with 14-3-3 protein and Raf // *Current biology : CB*. – 1997. – T. 7, № 5. – C. 294-300.
235. Jagemann L. R., Perez-Rivas L. G., Ruiz E. J., Ranea J. A., Sanchez-Jimenez F., Nebreda A. R., Alba E., Lozano J. The functional interaction of 14-3-3 proteins with the ERK1/2 scaffold KSR1 occurs in an isoform-specific manner // *J Biol Chem*. – 2008. – T. 283, № 25. – C. 17450-62.
236. Rezacbkova L., Man P., Novak P., Herman P., Vecer J., Obsilova V., Obsil T. Structural basis for the 14-3-3 protein-dependent inhibition of the regulator of G protein signaling 3 (RGS3) function // *J Biol Chem*. – 2011. – T. 286, № 50. – C. 43527-36.
237. Beguin P., Mahalakshmi R. N., Nagashima K., Cher D. H., Kuwamura N., Yamada Y., Seino Y., Hunziker W. Roles of 14-3-3 and calmodulin binding in subcellular localization and function of the small G-protein Rem2 // *Biochem J*. – 2005. – T. 390, № Pt 1. – C. 67-75.
238. Rezacbkova L., Kacirova M., Sulc M., Herman P., Vecer J., Stepanek M., Obsilova V., Obsil T. Structural modulation of phosphducin by phosphorylation and 14-3-3 protein binding // *Biophys J*. – 2012. – T. 103, № 9. – C. 1960-9.
239. Yuan L., Barbash S., Kongsamut S., Eishingdrelo A., Sakmar T. P., Eishingdrelo H. 14-3-3 signal adaptor and scaffold proteins mediate GPCR trafficking // *Sci Rep*. – 2019. – T. 9, № 1. – C. 11156.
240. Ganguly S., Gastel J. A., Weller J. L., Schwartz C., Jaffe H., Namboodiri M. A., Coon S. L., Hickman A. B., Rollag M., Obsil T., Beauverger P., Ferry G., Boutin J. A., Klein D. C. Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2001. – T. 98, № 14. – C. 8083-8.
241. Aghazadeh Y., Rone M. B., Blonder J., Ye X., Veenstra T. D., Hales D. B., Culty M., Papadopoulos V. Hormone-induced 14-3-3gamma adaptor protein regulates steroidogenic

- acute regulatory protein activity and steroid biosynthesis in MA-10 Leydig cells // *J Biol Chem.* – 2012. – T. 287, № 19. – C. 15380-94.
242. Aghazadeh Y., Ye X., Blonder J., Papadopoulos V. Protein modifications regulate the role of 14-3-3gamma adaptor protein in cAMP-induced steroidogenesis in MA-10 Leydig cells // *J Biol Chem.* – 2014. – T. 289, № 38. – C. 26542-53.
243. Ghorbani S., Fossbakk A., Jorge-Finnigan A., Flydal M. I., Haavik J., Kleppe R. Regulation of tyrosine hydroxylase is preserved across different homo- and heterodimeric 14-3-3 proteins // *Amino Acids.* – 2016. – T. 48, № 5. – C. 1221-9.
244. Hritz J., Byeon I. J., Krzysiak T., Martinez A., Sklenar V., Gronenborn A. M. Dissection of binding between a phosphorylated tyrosine hydroxylase peptide and 14-3-3zeta: A complex story elucidated by NMR // *Biophys J.* – 2014. – T. 107, № 9. – C. 2185-94.
245. Ichimura T., Uchiyama J., Kunihiro O., Ito M., Horigome T., Omata S., Shinkai F., Kaji H., Isobe T. Identification of the site of interaction of the 14-3-3 protein with phosphorylated tryptophan hydroxylase // *J Biol Chem.* – 1995. – T. 270, № 48. – C. 28515-8.
246. Ge Q., Huang N., Wynn R. M., Li Y., Du X., Miller B., Zhang H., Uyeda K. Structural characterization of a unique interface between carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) and 14-3-3beta protein // *J Biol Chem.* – 2012. – T. 287, № 50. – C. 41914-21.
247. Sadik G., Tanaka T., Kato K., Yamamori H., Nessa B. N., Morihara T., Takeda M. Phosphorylation of tau at Ser214 mediates its interaction with 14-3-3 protein: implications for the mechanism of tau aggregation // *J Neurochem.* – 2009. – T. 108, № 1. – C. 33-43.
248. Sluchanko N. N., Seit-Nebi A. S., Gusev N. B. Effect of phosphorylation on interaction of human tau protein with 14-3-3zeta // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2009. – T. 379, № 4. – C. 990-4.
249. Soosairajah J., Maiti S., Wiggan O., Sarmiere P., Moussi N., Sarcevic B., Sampath R., Bamberg J. R., Bernard O. Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin // *EMBO J.* – 2005. – T. 24, № 3. – C. 473-86.
250. Dreiza C. M., Brophy C. M., Komalavilas P., Furnish E. J., Joshi L., Pallero M. A., Murphy-Ullrich J. E., von Rechenberg M., Ho Y. S., Richardson B., Xu N., Zhen Y., Peltier J. M., Panitch A. Transducible heat shock protein 20 (HSP20) phosphopeptide alters cytoskeletal dynamics // *FASEB J.* – 2005. – T. 19, № 2. – C. 261-3.
251. Deakin N. O., Bass M. D., Warwood S., Schoelermann J., Mostafavi-Pour Z., Knight D., Ballestrom C., Humphries M. J. An integrin-alpha4-14-3-3zeta-paxillin ternary complex

- mediates localised Cdc42 activity and accelerates cell migration // *J Cell Sci.* – 2009. – T. 122, № Pt 10. – C. 1654-64.
252. Chatterjee D., Zhiping L. L., Tan S. M., Bhattacharjya S. Interaction Analyses of the Integrin beta2 Cytoplasmic Tail with the F3 FERM Domain of Talin and 14-3-3zeta Reveal a Ternary Complex with Phosphorylated Tail // *J Mol Biol.* – 2016.10.1016/j.jmb.2016.08.014.
253. Liao J., Omary M. B. 14-3-3 proteins associate with phosphorylated simple epithelial keratins during cell cycle progression and act as a solubility cofactor // *The Journal of cell biology.* – 1996. – T. 133, № 2. – C. 345-357.
254. Li H., Guo Y., Teng J., Ding M., Yu A. C., Chen J. 14-3-3gamma affects dynamics and integrity of glial filaments by binding to phosphorylated GFAP // *J Cell Sci.* – 2006. – T. 119, № Pt 21. – C. 4452-61.
255. Dorner C., Ullrich A., Haring H. U., Lammers R. The kinesin-like motor protein KIF1C occurs in intact cells as a dimer and associates with proteins of the 14-3-3 family // *J Biol Chem.* – 1999. – T. 274, № 47. – C. 33654-60.
256. Taoka K., Ohki I., Tsuji H., Furuita K., Hayashi K., Yanase T., Yamaguchi M., Nakashima C., Purwestri Y. A., Tamaki S., Ogaki Y., Shimada C., Nakagawa A., Kojima C., Shimamoto K. 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen // *Nature.* – 2011. – T. 476, № 7360. – C. 332-5.
257. Paul A.-L., Folta K., Ferl R. 14-3-3 proteins, red light and photoperiodic flowering: A point of connection? // *Plant signaling & behavior.* – 2008. – T. 3, № 8. – C. 511-515.
258. Jahn T., Fuglsang A. T., Olsson A., Brüntrup I. M., Collinge D. B., Volkmann D., Sommarin M., Palmgren M. G., Larsson C. The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane H(+)-ATPase // *The Plant cell.* – 1997. – T. 9, № 10. – C. 1805-1814.
259. Jaspert N., Oecking C. Regulatory 14-3-3 proteins bind the atypical motif within the C terminus of the plant plasma membrane H(+)-ATPase via their typical amphipathic groove // *Planta.* – 2002. – T. 216, № 1. – C. 136-139.
260. May T., Soll J. 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants // *Plant Cell.* – 2000. – T. 12, № 1. – C. 53-64.
261. Boon S. S., Banks L. High-risk human papillomavirus E6 oncoproteins interact with 14-3-3zeta in a PDZ binding motif-dependent manner // *J Virol.* – 2013. – T. 87, № 3. – C. 1586-95.

262. Boon S. S., Tomaic V., Thomas M., Roberts S., Banks L. Cancer-causing human papillomavirus E6 proteins display major differences in the phospho-regulation of their PDZ interactions // *J Virol.* – 2015. – T. 89, № 3. – C. 1579-86.
263. Edwards M. R., Hoad M., Tsimbalyuk S., Menicucci A. R., Messaoudi I., Forwood J. K., Basler C. F. Henipavirus W Proteins Interact with 14-3-3 To Modulate Host Gene Expression // *J Virol.* – 2020. – T. 94, № 14.
264. Han S. I., Kawano M. A., Ishizu K., Watanabe H., Hasegawa M., Kanesashi S. N., Kim Y. S., Nakanishi A., Kataoka K., Handa H. Rep68 protein of adeno-associated virus type 2 interacts with 14-3-3 proteins depending on phosphorylation at serine 535 // *Virology.* – 2004. – T. 320, № 1. – C. 144-55.
265. Tang Y., Zhang Y., Wang C., Sun Z., Li L., Dong J., Zhou W. 14-3-3zeta binds to hepatitis B virus protein X and maintains its protein stability in hepatocellular carcinoma cells // *Cancer Med.* – 2018. – T. 7, № 11. – C. 5543-5553.
266. Surjit M., Kumar R., Mishra R. N., Reddy M. K., Chow V. T., Lal S. K. The severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein is phosphorylated and localizes in the cytoplasm by 14-3-3-mediated translocation // *J Virol.* – 2005. – T. 79, № 17. – C. 11476-86.
267. Riedl W., Acharya D., Lee J. H., Liu G., Serman T., Chiang C., Chan Y. K., Diamond M. S., Gack M. U. Zika Virus NS3 Mimics a Cellular 14-3-3-Binding Motif to Antagonize RIG-I- and MDA5-Mediated Innate Immunity // *Cell Host Microbe.* – 2019. – T. 26, № 4. – C. 493-503 e6.
268. Qin S., Liu Y., Tempel W., Eram M. S., Bian C., Liu K., Senisterra G., Crombet L., Vedadi M., Min J. Structural basis for histone mimicry and hijacking of host proteins by influenza virus protein NS1 // *Nat Commun.* – 2014. – T. 5. – C. 3952.
269. Henriksson M. L., Trollér U., Hallberg B. 14-3-3 proteins are required for the inhibition of Ras by exoenzyme S // *The Biochemical journal.* – 2000. – T. 349 Pt 3. – C. 697-701.
270. Jin J., Smith D., Stark C., Wells C., Fawcett J., Kulkarni S., Metalnikov P., O'Donnell P., Taylor P., Taylor L., Zougman A., Woodgett J., Langeberg L., Scott J., Pawson T. Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization // *Current biology : CB.* – 2004. – T. 14, № 16. – C. 1436-1450.
271. Uhart M., Bustos D. M. Human 14-3-3 paralogs differences uncovered by cross-talk of phosphorylation and lysine acetylation // *PLoS One.* – 2013. – T. 8, № 2. – C. e55703.

272. Keshava Prasad T. S., Goel R., Kandasamy K., Keerthikumar S., Kumar S., Mathivanan S., Telikicherla D., Raju R., Shafreen B., Venugopal A., Balakrishnan L., Marimuthu A., Banerjee S., Somanathan D. S., Sebastian A., Rani S., Ray S., Harrys Kishore C. J., Kanth S., Ahmed M., Kashyap M. K., Mohmood R., Ramachandra Y. L., Krishna V., Rahiman B. A., Mohan S., Ranganathan P., Ramabadran S., Chaerkady R., Pandey A. Human Protein Reference Database--2009 update // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – T. 37, № Database issue. – C. D767-72.
273. Chatr-Aryamontri A., Breitkreutz B. J., Oughtred R., Boucher L., Heinicke S., Chen D., Stark C., Breitkreutz A., Kolas N., O'Donnell L., Reguly T., Nixon J., Ramage L., Winter A., Sellam A., Chang C., Hirschman J., Theesfeld C., Rust J., Livstone M. S., Dolinski K., Tyers M. The BioGRID interaction database: 2015 update // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – T. 43, № Database issue. – C. D470-8.
274. Orchard S., Ammari M., Aranda B., Breuza L., Briganti L., Broackes-Carter F., Campbell N. H., Chavali G., Chen C., del-Toro N., Duesbury M., Dumousseau M., Galeota E., Hinz U., Iannuccelli M., Jagannathan S., Jimenez R., Khadake J., Lagreid A., Licata L., Lovering R. C., Meldal B., Melidoni A. N., Milagros M., Peluso D., Perfetto L., Porras P., Raghunath A., Ricard-Blum S., Roechert B., Stutz A., Tognolli M., van Roey K., Cesareni G., Hermjakob H. The MIntAct project--IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – T. 42, № Database issue. – C. D358-63.
275. Salwinski L., Miller C. S., Smith A. J., Pettit F. K., Bowie J. U., Eisenberg D. The Database of Interacting Proteins: 2004 update // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – T. 32, № Database issue. – C. D449-51.
276. Calderone A., Castagnoli L., Cesareni G. mentha: a resource for browsing integrated protein-interaction networks // *Nat Methods.* – 2013. – T. 10, № 8. – C. 690-1.
277. Sawicka A., Seiser C. Sensing core histone phosphorylation - a matter of perfect timing // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – T. 1839, № 8. – C. 711-8.
278. Nathan K. G., Lal S. K. The Multifarious Role of 14-3-3 Family of Proteins in Viral Replication // *Viruses.* – 2020. – T. 12, № 4.
279. Sun S., Wong E. W., Li M. W., Lee W. M., Cheng C. Y. 14-3-3 and its binding partners are regulators of protein-protein interactions during spermatogenesis // *J Endocrinol.* – 2009. – T. 202, № 3. – C. 327-36.
280. Moreira J. M., Shen T., Ohlsson G., Gromov P., Gromova I., Celis J. E. A combined proteome and ultrastructural localization analysis of 14-3-3 proteins in transformed human amnion

- (AMA) cells: definition of a framework to study isoform-specific differences // *Mol Cell Proteomics*. – 2008. – T. 7, № 7. – C. 1225-40.
281. Kjarland E., Keen T. J., Kleppe R. Does isoform diversity explain functional differences in the 14-3-3 protein family? // *Curr Pharm Biotechnol*. – 2006. – T. 7, № 3. – C. 217-23.
282. Masone D., Uhart M., Bustos D. M. On the role of residue phosphorylation in 14-3-3 partners: AANAT as a case study // *Sci Rep*. – 2017. – T. 7. – C. 46114.
283. Ge F., Li W. L., Bi L. J., Tao S. C., Zhang Z. P., Zhang X. E. Identification of novel 14-3-3zeta interacting proteins by quantitative immunoprecipitation combined with knockdown (QUICK) // *J Proteome Res*. – 2010. – T. 9, № 11. – C. 5848-58.
284. Skjevick A. A., Mileni M., Baumann A., Halskau O., Teigen K., Stevens R. C., Martinez A. The N-terminal sequence of tyrosine hydroxylase is a conformationally versatile motif that binds 14-3-3 proteins and membranes // *J Mol Biol*. – 2014. – T. 426, № 1. – C. 150-68.
285. Kacirova M., Kosek D., Kadek A., Man P., Vecer J., Herman P., Obsilova V., Obsil T. Structural Characterization of Phosducin and Its Complex with the 14-3-3 Protein // *J Biol Chem*. – 2015. – T. 290, № 26. – C. 16246-60.
286. Kacirova M., Novacek J., Man P., Obsilova V., Obsil T. Structural Basis for the 14-3-3 Protein-Dependent Inhibition of Phosducin Function // *Biophys J*. – 2017. – T. 112, № 7. – C. 1339-1349.
287. Macakova E., Kopecka M., Kukacka Z., Veisova D., Novak P., Man P., Obsil T., Obsilova V. Structural basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1 // *Biochim Biophys Acta*. – 2013. – T. 1830, № 10. – C. 4491-9.
288. Petrvalska O., Kosek D., Kukacka Z., Tosner Z., Man P., Vecer J., Herman P., Obsilova V., Obsil T. Structural Insight into the 14-3-3 Protein-dependent Inhibition of Protein Kinase ASK1 (Apoptosis Signal-regulating kinase 1) // *J Biol Chem*. – 2016. – T. 291, № 39. – C. 20753-65.
289. Hu S. H., Whitten A. E., King G. J., Jones A., Rowland A. F., James D. E., Martin J. L. The weak complex between RhoGAP protein ARHGAP22 and signal regulatory protein 14-3-3 has 1:2 stoichiometry and a single peptide binding mode // *PLoS One*. – 2012. – T. 7, № 8. – C. e41731.
290. Silhan J., Vacha P., Strnadova P., Vecer J., Herman P., Sulc M., Teisinger J., Obsilova V., Obsil T. 14-3-3 protein masks the DNA binding interface of forkhead transcription factor FOXO4 // *J Biol Chem*. – 2009. – T. 284, № 29. – C. 19349-60.

291. Chalupska D., Eisenreichova A., Różycki B., Rezabkova L., Humpolickova J., Klima M., Boura E. Structural analysis of phosphatidylinositol 4-kinase III β (PI4KB) – 14-3-3 protein complex reveals internal flexibility and explains 14-3-3 mediated protection from degradation in vitro // *Journal of Structural Biology*. – 2017. – T. 200, № 1. – C. 36-44.
292. Smidova A., Alblova M., Kalabova D., Psenakova K., Rosulek M., Herman P., Obsil T., Obsilova V. 14-3-3 protein masks the nuclear localization sequence of caspase-2 // *FEBS J*. – 2018. – T. 285, № 22. – C. 4196-4213.
293. Sato S., Jung H., Nakagawa T., Pawlosky R., Takeshima T., Lee W. R., Sakiyama H., Laxman S., Wynn R. M., Tu B. P., MacMillan J. B., De Brabander J. K., Veech R. L., Uyeda K. Metabolite Regulation of Nuclear Localization of Carbohydrate-response Element-binding Protein (ChREBP): ROLE OF AMP AS AN ALLOSTERIC INHIBITOR // *J Biol Chem*. – 2016. – T. 291, № 20. – C. 10515-27.
294. Alblova M., Smidova A., Docekal V., Vesely J., Herman P., Obsilova V., Obsil T. Molecular basis of the 14-3-3 protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1 // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2017. – T. 114, № 46. – C. E9811-E9820.
295. Karlberg T., Hornyak P., Pinto A. F., Milanova S., Ebrahimi M., Lindberg M., Pullen N., Nordstrom A., Loverli E., Caraballo R., Wong E. V., Nareoja K., Thorsell A. G., Elofsson M., De La Cruz E. M., Bjorkegren C., Schuler H. 14-3-3 proteins activate *Pseudomonas* exotoxins-S and -T by chaperoning a hydrophobic surface // *Nat Commun*. – 2018. – T. 9, № 1. – C. 3785.
296. Liao N. P. D., Wendorff T. J., Quinn J. G., Steffek M., Phung W., Liu P., Tang J., Irudayanathan F. J., Izadi S., Shaw A. S., Malek S., Hymowitz S. G., Sudhamsu J. Negative regulation of RAF kinase activity by ATP is overcome by 14-3-3-induced dimerization // *Nat Struct Mol Biol*. – 2020. – T. 27, № 2. – C. 134-141.
297. Kondo Y., Ognjenovic J., Banerjee S., Karandur D., Merk A., Kulhanek K., Wong K., Roose J. P., Subramaniam S., Kuriyan J. Cryo-EM structure of a dimeric B-Raf:14-3-3 complex reveals asymmetry in the active sites of B-Raf kinases // *Science*. – 2019. – T. 366, № 6461. – C. 109-115.
298. Park E., Rawson S., Li K., Kim B. W., Ficarro S. B., Pino G. G., Sharif H., Marto J. A., Jeon H., Eck M. J. Architecture of autoinhibited and active BRAF-MEK1-14-3-3 complexes // *Nature*. – 2019. – T. 575, № 7783. – C. 545-550.
299. Nagy G., Oostenbrink C., Hritz J. Exploring the binding pathways of the 14-3-3zeta protein: Structural and free-energy profiles revealed by Hamiltonian replica exchange molecular

- dynamics with distancefield distance restraints // PLoS One. – 2017. – T. 12, № 7. – C. e0180633.
300. Kato K., Goto S., Inaguma Y., Hasegawa K., Morishita R., Asano T. Purification and characterization of a 20-kDa protein that is highly homologous to alpha B crystallin // J Biol Chem. – 1994. – T. 269, № 21. – C. 15302-9.
 301. Taylor R. P., Benjamin I. J. Small heat shock proteins: a new classification scheme in mammals // J Mol Cell Cardiol. – 2005. – T. 38, № 3. – C. 433-44.
 302. Kirbach B. B., Golenhofen N. Differential expression and induction of small heat shock proteins in rat brain and cultured hippocampal neurons // J Neurosci Res. – 2011. – T. 89, № 2. – C. 162-75.
 303. Kim N. K., Joh J. H., Park H. R., Kim O. H., Park B. Y., Lee C. S. Differential expression profiling of the proteomes and their mRNAs in porcine white and red skeletal muscles // Proteomics. – 2004. – T. 4, № 11. – C. 3422-8.
 304. Cross B. E., O'Dea H. M., MacPhee D. J. Expression of small heat shock-related protein 20 (HSP20) in rat myometrium is markedly decreased during late pregnancy and labour // Reproduction. – 2007. – T. 133, № 4. – C. 807-17.
 305. McHaourab H. S., Godar J. A., Stewart P. L. Structure and mechanism of protein stability sensors: chaperone activity of small heat shock proteins // Biochemistry. – 2009. – T. 48, № 18. – C. 3828-37.
 306. Vos M. J., Hageman J., Carra S., Kampinga H. H. Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families // Biochemistry. – 2008. – T. 47, № 27. – C. 7001-11.
 307. van de Klundert F. A., Smulders R. H., Gijzen M. L., Lindner R. A., Jaenicke R., Carver J. A., de Jong W. W. The mammalian small heat-shock protein Hsp20 forms dimers and is a poor chaperone // Eur J Biochem. – 1998. – T. 258, № 3. – C. 1014-21.
 308. Bukach O. V., Seit-Nebi A. S., Marston S. B., Gusev N. B. Some properties of human small heat shock protein Hsp20 (HspB6) // Eur J Biochem. – 2004. – T. 271, № 2. – C. 291-302.
 309. Mymrikov E. V., Bukach O. V., Seit-Nebi A. S., 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. – T. 15, № 4. – C. 365-77.
 310. van de Klundert F., van den I. P., Stege G. J., de Jong W. W. Rat Hsp20 confers thermoresistance in a clonal survival assay, but fails to protect coexpressed luciferase in

- Chinese hamster ovary cells // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1999. – T. 254, № 1. – C. 164-8.
311. Kappe G., Franck E., Verschuure P., Boelens W. C., Leunissen J. A., de Jong W. W. The human genome encodes 10 alpha-crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10 // *Cell Stress Chaperones.* – 2003. – T. 8, № 1. – C. 53-61.
312. Fontaine J. M., Rest J. S., Welsh M. J., Benndorf R. The sperm outer dense fiber protein is the 10th member of the superfamily of mammalian small stress proteins // *Cell Stress Chaperones.* – 2003. – T. 8, № 1. – C. 62-9.
313. Weeks S. D., Baranova E. V., Heirbaut M., Beelen S., Shkumatov A. V., Gusev N. B., Strelkov S. V. Molecular structure and dynamics of the dimeric human small heat shock protein HSPB6 // *J Struct Biol.* – 2014. – T. 185, № 3. – C. 342-54.
314. Bagneris C., Bateman O. A., Naylor C. E., Cronin N., Boelens W. C., Keep N. H., Slingsby C. Crystal structures of alpha-crystallin domain dimers of alphaB-crystallin and Hsp20 // *J Mol Biol.* – 2009. – T. 392, № 5. – C. 1242-52.
315. Laganowsky A., Benesch J. L., Landau M., Ding L., Sawaya M. R., Cascio D., Huang Q., Robinson C. V., Horwitz J., Eisenberg D. Crystal structures of truncated alphaA and alphaB crystallins reveal structural mechanisms of polydispersity important for eye lens function // *Protein Sci.* – 2010. – T. 19, № 5. – C. 1031-43.
316. Laganowsky A., Eisenberg D. Non-3D domain swapped crystal structure of truncated zebrafish alphaA crystallin // *Protein Sci.* – 2010. – T. 19, № 10. – C. 1978-84.
317. Delbecq S. P., Jehle S., Klevit R. Binding determinants of the small heat shock protein, alphaB-crystallin: recognition of the 'IxI' motif // *EMBO J.* – 2012. – T. 31, № 24. – C. 4587-94.
318. Lindner R. A., Treweek T. M., Carver J. A. The molecular chaperone alpha-crystallin is in kinetic competition with aggregation to stabilize a monomeric molten-globule form of alpha-lactalbumin // *Biochem J.* – 2001. – T. 354, № Pt 1. – C. 79-87.
319. Brophy C. M., Dickinson M., Woodrum D. Phosphorylation of the small heat shock-related protein, HSP20, in vascular smooth muscles is associated with changes in the macromolecular associations of HSP20 // *J Biol Chem.* – 1999. – T. 274, № 10. – C. 6324-9.
320. Salinthon S., Tyagi M., Gerthoffer W. T. Small heat shock proteins in smooth muscle // *Pharmacol Ther.* – 2008. – T. 119, № 1. – C. 44-54.
321. Fan G. C., Kranias E. G. Small heat shock protein 20 (HspB6) in cardiac hypertrophy and failure // *J Mol Cell Cardiol.* – 2011. – T. 51, № 4. – C. 574-7.

322. Sudnitsyna M. V., Mymrikov E. V., Seit-Nebi A. S., Gusev N. B. The role of intrinsically disordered regions in the structure and functioning of small heat shock proteins // *Curr Protein Pept Sci.* – 2012. – T. 13, № 1. – C. 76-85.
323. Beall A., Bagwell D., Woodrum D., Stoming T. A., Kato K., Suzuki A., Rasmussen H., Brophy C. M. The small heat shock-related protein, HSP20, is phosphorylated on serine 16 during cyclic nucleotide-dependent relaxation // *J Biol Chem.* – 1999. – T. 274, № 16. – C. 11344-51.
324. Hojlund K., Bowen B. P., Hwang H., Flynn C. R., Madireddy L., Geetha T., Langlais P., Meyer C., Mandarino L. J., Yi Z. In vivo phosphoproteome of human skeletal muscle revealed by phosphopeptide enrichment and HPLC-ESI-MS/MS // *J Proteome Res.* – 2009. – T. 8, № 11. – C. 4954-65.
325. Beall A. C., Kato K., Goldenring J. R., Rasmussen H., Brophy C. M. Cyclic nucleotide-dependent vasorelaxation is associated with the phosphorylation of a small heat shock-related protein // *J Biol Chem.* – 1997. – T. 272, № 17. – C. 11283-7.
326. Rembold C. M., Foster D. B., Strauss J. D., Wingard C. J., Eyk J. E. cGMP-mediated phosphorylation of heat shock protein 20 may cause smooth muscle relaxation without myosin light chain dephosphorylation in swine carotid artery // *J Physiol.* – 2000. – T. 524 Pt 3. – C. 865-78.
327. Woodrum D. A., Brophy C. M., Wingard C. J., Beall A., Rasmussen H. Phosphorylation events associated with cyclic nucleotide-dependent inhibition of smooth muscle contraction // *Am J Physiol.* – 1999. – T. 277, № 3 Pt 2. – C. H931-9.
328. Frobert O., Buus C. L., Rembold C. M. HSP20 phosphorylation and interstitial metabolites in hypoxia-induced dilation of swine coronary arteries // *Acta Physiol Scand.* – 2005. – T. 184, № 1. – C. 37-44.
329. O'Connor M. J., Rembold C. M. Heat-induced force suppression and HSP20 phosphorylation in swine carotid media // *J Appl Physiol (1985).* – 2002. – T. 93, № 2. – C. 484-8.
330. Brophy C. M., Lamb S., Graham A. The small heat shock-related protein-20 is an actin-associated protein // *J Vasc Surg.* – 1999. – T. 29, № 2. – C. 326-33.
331. Woodrum D., Pipkin W., Tessier D., Komalavilas P., Brophy C. M. Phosphorylation of the heat shock-related protein, HSP20, mediates cyclic nucleotide-dependent relaxation // *J Vasc Surg.* – 2003. – T. 37, № 4. – C. 874-81.

332. Tessier D. J., Komalavilas P., Panitch A., Joshi L., Brophy C. M. The small heat shock protein (HSP) 20 is dynamically associated with the actin cross-linking protein actinin // *J Surg Res.* – 2003. – T. 111, № 1. – C. 152-7.
333. Sluchanko N. N., Sudnitsyna M. V., Chernik I. S., Seit-Nebi A. S., Gusev N. B. Phosphomimicking mutations of human 14-3-3zeta affect its interaction with tau protein and small heat shock protein HspB6 // *Arch Biochem Biophys.* – 2011. – T. 506, № 1. – C. 24-34.
334. Gohla A., Bokoch G. M. 14-3-3 regulates actin dynamics by stabilizing phosphorylated cofilin // *Curr Biol.* – 2002. – T. 12, № 19. – C. 1704-10.
335. Sudnitsyna M. V., Seit-Nebi A. S., Gusev N. B. Cofilin weakly interacts with 14-3-3 and therefore can only indirectly participate in regulation of cell motility by small heat shock protein HspB6 (Hsp20) // *Arch Biochem Biophys.* – 2012. – T. 521, № 1-2. – C. 62-70.
336. Freeman A. K., Morrison D. K. 14-3-3 Proteins: diverse functions in cell proliferation and cancer progression // *Semin Cell Dev Biol.* – 2011. – T. 22, № 7. – C. 681-7.
337. Mizuno K. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation // *Cell Signal.* – 2013. – T. 25, № 2. – C. 457-69.
338. Sluchanko N. N., Gusev N. B. 14-3-3 proteins and regulation of cytoskeleton // *Biochemistry (Mosc).* – 2010. – T. 75, № 13. – C. 1528-46.
339. An S. S., Askovich P. S., Zarembinski T. I., Ahn K., Peltier J. M., von Rechenberg M., Sahasrabudhe S., Fredberg J. J. A novel small molecule target in human airway smooth muscle for potential treatment of obstructive lung diseases: a staged high-throughput biophysical screening // *Respiratory Research.* – 2011. – T. 12, № 1. – C. 8.
340. Flynn C. R., Smoke C. C., Furnish E., Komalavilas P., Thresher J., Yi Z., Mandarino L. J., Brophy C. M. Phosphorylation and activation of a transducible recombinant form of human HSP20 in *Escherichia coli* // *Protein Expr Purif.* – 2007. – T. 52, № 1. – C. 50-8.
341. McLemore E. C., Tessier D. J., Flynn C. R., Furnish E. J., Komalavilas P., Thresher J. S., Joshi L., Stone W. M., Fowl R. J., Brophy C. M. Transducible recombinant small heat shock-related protein, HSP20, inhibits vasospasm and platelet aggregation // *Surgery.* – 2004. – T. 136, № 3. – C. 573-8.
342. Tessier D. J., Komalavilas P., Liu B., Kent C. K., Thresher J. S., Dreiza C. M., Panitch A., Joshi L., Furnish E., Stone W., Fowl R., Brophy C. M. Transduction of peptide analogs of the small heat shock-related protein HSP20 inhibits intimal hyperplasia // *J Vasc Surg.* – 2004. – T. 40, № 1. – C. 106-14.

343. Lopes L. B., Furnish E. J., Komalavilas P., Flynn C. R., Ashby P., Hansen A., Ly D. P., Yang G. P., Longaker M. T., Panitch A., Brophy C. M. Cell permeant peptide analogues of the small heat shock protein, HSP20, reduce TGF-beta1-induced CTGF expression in keloid fibroblasts // *J Invest Dermatol.* – 2009. – T. 129, № 3. – C. 590-8.
344. Komalavilas P., Penn R. B., Flynn C. R., Thresher J., Lopes L. B., Furnish E. J., Guo M., Pallero M. A., Murphy-Ullrich J. E., Brophy C. M. The small heat shock-related protein, HSP20, is a cAMP-dependent protein kinase substrate that is involved in airway smooth muscle relaxation // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2008. – T. 294, № 1. – C. L69-78.
345. Furnish E. J., Brophy C. M., Harris V. A., Macomson S., Winger J., Head G. A., Shaver E. G. Treatment with transducible phosphopeptide analogues of the small heat shock-related protein, HSP20, after experimental subarachnoid hemorrhage: prevention and reversal of delayed decreases in cerebral perfusion // *J Neurosurg.* – 2010. – T. 112, № 3. – C. 631-9.
346. Narayana N., Cox S., Shaltiel S., Taylor S. S., Xuong N. Crystal structure of a polyhistidine-tagged recombinant catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with the peptide inhibitor PKI(5-24) and adenosine // *Biochemistry.* – 1997. – T. 36, № 15. – C. 4438-48.
347. Alexandrov A., Dutta K., Pascal S. M. MBP fusion protein with a viral protease cleavage site: one-step cleavage/purification of insoluble proteins // *Biotechniques.* – 2001. – T. 30, № 6. – C. 1194-8.
348. Baranova E. V., Weeks S. D., Beelen S., Bukach O. V., Gusev N. B., Strelkov S. V. Three-dimensional structure of alpha-crystallin domain dimers of human small heat shock proteins HSPB1 and HSPB6 // *J Mol Biol.* – 2011. – T. 411, № 1. – C. 110-22.
349. Bose H. S., Whittal R. M., Baldwin M. A., Miller W. L. The active form of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR, appears to be a molten globule // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1999. – T. 96, № 13. – C. 7250-5.
350. Logvinova D. S., Markov D. I., Nikolaeva O. P., Sluchanko N. N., Ushakov D. S., Levitsky D. I. Does Interaction between the Motor and Regulatory Domains of the Myosin Head Occur during ATPase Cycle? Evidence from Thermal Unfolding Studies on Myosin Subfragment 1 // *PLoS One.* – 2015. – T. 10, № 9. – C. e0137517.
351. Chebotareva N. A., Makeeva V. F., Bazhina S. G., Eronina T. B., Gusev N. B., Kurganov B. I. Interaction of Hsp27 with native phosphorylase kinase under crowding conditions // *Macromol Biosci.* – 2010. – T. 10, № 7. – C. 783-9.

352. Chebotareva N. A., Meremyanin A. V., Makeeva V. F., Kurganov B. I. Self-association of phosphorylase kinase under molecular crowding conditions // *Progr. Colloid Polym. Sci.* – 2006. – Т. 131. – С. 83–92.
353. Chebotareva N. A., Meremyanin A. V., Makeeva V. F., Livanova N. B., Kurganov B. I. Cooperative self-association of phosphorylase kinase from rabbit skeletal muscle // *Biophys Chem.* – 2008. – Т. 133, № 1-3. – С. 45-53.
354. Sarkar G., Sommer S. S. The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis // *Biotechniques.* – 1990. – Т. 8, № 4. – С. 404-407.
355. Goldschmidt L., Cooper D. R., Derewenda Z. S., Eisenberg D. Toward rational protein crystallization: A Web server for the design of crystallizable protein variants // *Protein Sci.* – 2007. – Т. 16, № 8. – С. 1569-76.
356. Chin J. X., Chung B. K., Lee D. Y. Codon Optimization OnLine (COOL): a web-based multi-objective optimization platform for synthetic gene design // *Bioinformatics.* – 2014. – Т. 30, № 15. – С. 2210-2.
357. Zhang Y., Werling U., Edelman W. SLiCE: a novel bacterial cell extract-based DNA cloning method // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – Т. 40, № 8. – С. e55.
358. Chung C. T., Niemela S. L., Miller R. H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1989. – Т. 86, № 7. – С. 2172-5.
359. Studier F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures // *Protein Expr Purif.* – 2005. – Т. 41, № 1. – С. 207-34.
360. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Т. 227, № 5259. – С. 680-685.
361. "Физическая биохимия". М., Мир. / Фрайфельдер Д. – Москва: Мир, 1980. М., Мир.
362. Wang H., Zhang L., Liddington R., Fu H. Mutations in the hydrophobic surface of an amphipathic groove of 14-3-3zeta disrupt its interaction with Raf-1 kinase // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Т. 273, № 26. – С. 16297-16304.
363. "Молекулярная биология. Том 1: Физические методы в молекулярной биологии" Итоги науки и техники, Молекулярная биология /Болотина И. А. – Москва: Москва, 1973. Итоги науки и техники, Молекулярная биология
364. Greenfield N., Fasman G. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation // *Biochemistry.* – 1969. – Т. 8, № 10. – С. 4108-4116.

365. Sreerama N., Woody R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set // *Anal Biochem.* – 2000. – Т. 287, № 2. – С. 252-260.
366. "Метод собственной люминесценции белка". М., Наука. / Пермяков Е. А. – Москва: Наука, 2003. М., Наука.
367. Molecular probes: Handbook of fluorescent probes and research chemicals. / Haugland R. P. – Sixth edition изд. – Leiden, 1996.
368. Medvedeva M. V., Bushueva T. L., Shirinsky V. P., Lukas T. J., Watterson D. M., Gusev N. B. Interaction of smooth muscle caldesmon with calmodulin mutants // *FEBS Lett.* – 1995. – Т. 360, № 1. – С. 89-92.
369. Wang Z. X. An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule // *FEBS Lett.* – 1995. – Т. 360, № 2. – С. 111-4.
370. Simon M. A., Ecsedi P., Kovacs G. M., Poti A. L., Remenyi A., Kardos J., Gogl G., Nyitray L. High-throughput competitive fluorescence polarization assay reveals functional redundancy in the S100 protein family // *FEBS J.* – 2020. – Т. 287, № 13. – С. 2834-2846.
371. Roehrl M. H., Wang J. Y., Wagner G. A general framework for development and data analysis of competitive high-throughput screens for small-molecule inhibitors of protein-protein interactions by fluorescence polarization // *Biochemistry.* – 2004. – Т. 43, № 51. – С. 16056-66.
372. Lin K., Wu G. Isothermal Titration Calorimetry Assays to Measure Binding Affinities In Vitro // *Methods Mol Biol.* – 2019. – Т. 1893. – С. 257-272.
373. Miura K. An Overview of Current Methods to Confirm Protein-Protein Interactions // *Protein Pept Lett.* – 2018. – Т. 25, № 8. – С. 728-733.
374. Sweadner K. J. Size, shape, and solubility of a class of releasable cell surface proteins of sympathetic neurons // *J Neurosci.* – 1983. – Т. 3, № 12. – С. 2518-24.
375. Andersson M., Wittgren B., Wahlund K. G. Accuracy in multiangle light scattering measurements for molar mass and radius estimations. Model calculations and experiments // *Anal Chem.* – 2003. – Т. 75, № 16. – С. 4279-91.
376. Lebowitz J., Lewis M. S., Schuck P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review // *Protein Sci.* – 2002. – Т. 11, № 9. – С. 2067-79.
377. Schuck P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling // *Biophys J.* – 2000. – Т. 78, № 3. – С. 1606-19.

378. Brown P. H., Balbo A., Schuck P. On the analysis of sedimentation velocity in the study of protein complexes // *Eur Biophys J.* – 2009. – T. 38, № 8. – C. 1079-99.
379. Brown P. H., Schuck P. Macromolecular size-and-shape distributions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation // *Biophys J.* – 2006. – T. 90, № 12. – C. 4651-61.
380. Harding S. E., Schuck P., Abdelhameed A. S., Adams G., Kok M. S., Morris G. A. Extended Fujita approach to the molecular weight distribution of polysaccharides and other polymeric systems // *Methods.* – 2011. – T. 54, № 1. – C. 136-44.
381. "Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science". / Laue T. M., Shah B. D., Ridgeway T. M., Pelletier S. L. – Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1992. – 90 c.
382. Hubbard S. J. The structural aspects of limited proteolysis of native proteins // *Biochim Biophys Acta.* – 1998. – T. 1382, № 2. – C. 191-206.
383. Rusconi F. massXpert 2: a cross-platform software environment for polymer chemistry modelling and simulation/analysis of mass spectrometric data // *Bioinformatics.* – 2009. – T. 25, № 20. – C. 2741-2.
384. Bushueva T. L., Busel E. P., Burstein E. A. Relationship of thermal quenching of protein fluorescence to intramolecular structural mobility // *Biochim Biophys Acta.* – 1978. – T. 534, № 1. – C. 141-52.
385. Bushueva T. L., Busel E. P., Burstein E. A. Some regularities of dynamic accessibility of buried fluorescent residues to external quenchers in proteins // *Arch Biochem Biophys.* – 1980. – T. 204, № 1. – C. 161-166.
386. Handbook of chemistry and physics. / Weast R. – 57th edition изд. – Cleveland: CRC Press, 1976-1977.
387. Greenfield N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure // *Nat Protoc.* – 2006. – T. 1, № 6. – C. 2876-90.
388. Greenfield N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions // *Nat Protoc.* – 2006. – T. 1, № 6. – C. 2527-35.
389. Privalov P. L., Potekhin S. A. Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins // *Methods Enzymol.* – 1986. – T. 131. – C. 4-51.
390. Kremneva E., Nikolaeva O., Maytum R., Arutyunyan A. M., Kleimenov S. Y., Geeves M. A., Levitsky D. I. Thermal unfolding of smooth muscle and nonmuscle tropomyosin alpha-homodimers with alternatively spliced exons // *FEBS J.* – 2006. – T. 273, № 3. – C. 588-600.

391. Migneault I., Dartiguenave C., Bertrand M. J., Waldron K. C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking // *Biotechniques*. – 2004. – T. 37, № 5. – C. 790-6, 798-802.
392. Wong S. S., Wong L. J. Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes // *Enzyme Microb Technol.* – 1992. – T. 14, № 11. – C. 866-74.
393. Stetefeld J., McKenna S. A., Patel T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences // *Biophys Rev.* – 2016. – T. 8, № 4. – C. 409-427.
394. Yang Y., Zhou H. M. Effect of zinc ions on conformational stability of yeast alcohol dehydrogenase // *Biochemistry (Mosc)*. – 2001. – T. 66, № 1. – C. 47-54.
395. Liu W., Nadeau O. W., Sage J., Carlson G. M. Physicochemical changes in phosphorylase kinase induced by its cationic activator Mg(2+) // *Protein Sci.* – 2013. – T. 22, № 4. – C. 444-54.
396. Liu W., Priddy T. S., Carlson G. M. Physicochemical changes in phosphorylase kinase associated with its activation // *Protein Sci.* – 2008. – T. 17, № 12. – C. 2111-9.
397. Nadeau O. W., Carlson G. M., Gogol E. P. A Ca(2+)-dependent global conformational change in the 3D structure of phosphorylase kinase obtained from electron microscopy // *Structure*. – 2002. – T. 10, № 1. – C. 23-32.
398. Wilkinson D. A., Fitzgerald T. J., Marion T. N., Carlson G. M. Mg²⁺ induces conformational changes in the catalytic subunit of phosphorylase kinase, whether by itself or as part of the holoenzyme complex // *J Protein Chem.* – 1999. – T. 18, № 2. – C. 157-64.
399. Kabsch W. Xds // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 2010. – T. 66, № Pt 2. – C. 125-32.
400. Legrand P. *xdsme* // *Book xdsme* / Editor, 2009.
401. Vagin A., Teplyakov A. Molecular replacement with MOLREP // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 2010. – T. 66, № Pt 1. – C. 22-5.
402. Blanc E., Roversi P., Vornrhein C., Flensburg C., Lea S. M., Bricogne G. Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER-TNT // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 2004. – T. 60, № Pt 12 Pt 1. – C. 2210-21.
403. Emsley P., Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 2004. – T. 60, № Pt 12 Pt 1. – C. 2126-32.
404. McCoy A. J., Grosse-Kunstleve R. W., Adams P. D., Winn M. D., Storoni L. C., Read R. J. Phaser crystallographic software // *J Appl Crystallogr.* – 2007. – T. 40, № Pt 4. – C. 658-674.
405. Adams P. D., Afonine P. V., Bunkoczi G., Chen V. B., Davis I. W., Echols N., Headd J. J., Hung L. W., Kapral G. J., Grosse-Kunstleve R. W., McCoy A. J., Moriarty N. W., Oeffner R.,

- Read R. J., Richardson D. C., Richardson J. S., Terwilliger T. C., Zwart P. H. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 2010. – T. 66, № Pt 2. – C. 213-21.
406. Lebedev A. A., Isupov M. N. Space-group and origin ambiguity in macromolecular structures with pseudo-symmetry and its treatment with the program Zanuda // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 2014. – T. 70, № Pt 9. – C. 2430-43.
407. Trewthella J. Small Angle Scattering and Structural Biology: Data Quality and Model Validation // *Adv Exp Med Biol.* – 2018. – T. 1105. – C. 77-100.
408. Korasick D. A., Tanner J. J. Determination of protein oligomeric structure from small-angle X-ray scattering // *Protein Sci.* – 2018. – T. 27, № 4. – C. 814-824.
409. Tuukkanen A. T., Spilotros A., Svergun D. I. Progress in small-angle scattering from biological solutions at high-brilliance synchrotrons // *IUCrJ.* – 2017. – T. 4, № Pt 5. – C. 518-528.
410. Gronenborn A. M. Harnessing the Combined Power of SAXS and NMR // *Adv Exp Med Biol.* – 2018. – T. 1105. – C. 171-180.
411. Brosey C. A., Tainer J. A. Evolving SAXS versatility: solution X-ray scattering for macromolecular architecture, functional landscapes, and integrative structural biology // *Curr Opin Struct Biol.* – 2019. – T. 58. – C. 197-213.
412. Malaby A. W., Chakravarthy S., Irving T. C., Kathuria S. V., Bilsel O., Lambright D. G. Methods for analysis of size-exclusion chromatography-small-angle X-ray scattering and reconstruction of protein scattering // *J Appl Crystallogr.* – 2015. – T. 48, № Pt 4. – C. 1102-1113.
413. Wright G. S., Lee H. C., Schulze-Briese C., Grossmann J. G., Strange R. W., Hasnain S. S. The application of hybrid pixel detectors for in-house SAXS instrumentation with a view to combined chromatographic operation // *J Synchrotron Radiat.* – 2013. – T. 20, № Pt 2. – C. 383-5.
414. Petoukhov M. V., Franke D., Shkumatov A. V., Tria G., Kikhney A. G., Gajda M., Gorba C., Mertens H. D. T., Konarev P. V., Svergun D. I. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis // *J. Appl. Cryst.* – 2012. – T. 45. – C. 342-350.
415. Franke D., Petoukhov M. V., Konarev P. V., Panjkovich A., Tuukkanen A., Mertens H. D. T., Kikhney A. G., Hajizadeh N. R., Franklin J. M., Jeffries C. M., Svergun D. I. ATSAS 2.8: a

- comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions // *J Appl Crystallogr.* – 2017. – T. 50, № Pt 4. – C. 1212-1225.
416. Svergun D. I., Barberato C., Koch M. H. J. CRY SOL - a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates // *J. Appl. Cryst.* – 1995. – T. 28. – C. 768-773.
417. Gront D., Kolinski A. BioShell--a package of tools for structural biology computations // *Bioinformatics.* – 2006. – T. 22, № 5. – C. 621-2.
418. Krivov G. G., Shapovalov M. V., Dunbrack R. L., Jr. Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4 // *Proteins.* – 2009. – T. 77, № 4. – C. 778-95.
419. Blanchet C. E., Spilotros A., Schwemmer F., Graewert M. A., Kikhney A., Jeffries C. M., Franke D., Mark D., Zengerle R., Cipriani F., Fiedler S., Roessle M., Svergun D. I. Versatile sample environments and automation for biological solution X-ray scattering experiments at the P12 beamline (PETRA III, DESY) // *J Appl Crystallogr.* – 2015. – T. 48, № Pt 2. – C. 431-443.
420. Graewert M. A., Franke D., Jeffries C. M., Blanchet C. E., Ruskule D., Kuhle K., Flieger A., Schafer B., Tartsch B., Meijers R., Svergun D. I. Automated pipeline for purification, biophysical and x-ray analysis of biomacromolecular solutions // *Sci Rep.* – 2015. – T. 5. – C. 10734.
421. Franke D., Kikhney A. G., Svergun D. I. Automated acquisition and analysis of small angle X-ray scattering data // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment.* – 2012. – T. 689, № Supplement C. – C. 52-59.
422. Panjkovich A., Svergun D. I. CHROMIXS: automatic and interactive analysis of chromatography-coupled small-angle X-ray scattering data // *Bioinformatics.* – 2018. – T. 34, № 11. – C. 1944-1946.
423. Konarev P. V., Volkov V. V., Sokolova A. V., Koch M. H. J., Svergun D. I. PRIMUS - a Windows-PC based system for small-angle scattering data analysis // *J. Appl. Cryst.* – 2003. – T. 36. – C. 1277-1282.
424. Svergun D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria // *J. Appl. Cryst.* – 1992. – T. 25. – C. 495-503.
425. Rambo R. P., Tainer J. A. Accurate assessment of mass, models and resolution by small-angle scattering // *Nature.* – 2013. – T. 496, № 7446. – C. 477-81.

426. Svergun D. I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing // *Biophys J.* – 1999. – T. 76, № 6. – C. 2879-86.
427. Volkov V. V., Svergun D. I. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering // *J. Appl. Cryst.* – 2003. – T. 36. – C. 860-864.
428. Bernado P., Mylonas E., Petoukhov M. V., Blackledge M., Svergun D. I. Structural characterization of flexible proteins using small-angle X-ray scattering // *J Am Chem Soc.* – 2007. – T. 129, № 17. – C. 5656-64.
429. Dyson H. J., Wright P. E. Coupling of folding and binding for unstructured proteins // *Curr Opin Struct Biol.* – 2002. – T. 12, № 1. – C. 54-60.
430. Dunker A. K., Brown C. J., Lawson J. D., Iakoucheva L. M., Obradovic Z. Intrinsic disorder and protein function // *Biochemistry.* – 2002. – T. 41, № 21. – C. 6573-82.
431. Dunker A. K., Lawson J. D., Brown C. J., Williams R. M., Romero P., Oh J. S., Oldfield C. J., Campen A. M., Ratliff C. M., Hipps K. W., Ausio J., Nissen M. S., Reeves R., Kang C., Kissinger C. R., Bailey R. W., Griswold M. D., Chiu W., Garner E. C., Obradovic Z. Intrinsically disordered protein // *J Mol Graph Model.* – 2001. – T. 19, № 1. – C. 26-59.
432. Obradovic Z., Peng K., Vucetic S., Radivojac P., Dunker A. K. Exploiting heterogeneous sequence properties improves prediction of protein disorder // *Proteins.* – 2005. – T. 61 Suppl 7. – C. 176-82.
433. Obradovic Z., Peng K., Vucetic S., Radivojac P., Brown C. J., Dunker A. K. Predicting intrinsic disorder from amino acid sequence // *Proteins.* – 2003. – T. 53 Suppl 6. – C. 566-72.
434. Xue B., Dunbrack R. L., Williams R. W., Dunker A. K., Uversky V. N. PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids // *Biochim Biophys Acta.* – 2010. – T. 1804, № 4. – C. 996-1010.
435. Dosztanyi Z., Csizmok V., Tompa P., Simon I. IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content // *Bioinformatics.* – 2005. – T. 21, № 16. – C. 3433-4.
436. Yang Z. R., Thomson R., McNeil P., Esnouf R. M. RONN: the bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins // *Bioinformatics.* – 2005. – T. 21, № 16. – C. 3369-76.
437. Oldfield C. J., Cheng Y., Cortese M. S., Brown C. J., Uversky V. N., Dunker A. K. Comparing and combining predictors of mostly disordered proteins // *Biochemistry.* – 2005. – T. 44, № 6. – C. 1989-2000.
438. *The Protein Protocols Handbook.* / Walker J. M., 2002.

439. Schaub M. C., Perry S. V. The relaxing protein system of striated muscle. Resolution of the troponin complex into inhibitory and calcium ion-sensitizing factors and their relationship to tropomyosin // *Biochem J.* – 1969. – Т. 115, № 5. – С. 993-1004.
440. "Фоторецептурный справочник". М., Искусство. / Микулин В. П. – Москва: Искусство, 1969. М., Искусство.
441. Di Tommaso P., Moretti S., Xenarios I., Orobitz M., Montanyola A., Chang J. M., Taly J. F., Notredame C. T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – Т. 39, № Web Server issue. – С. W13-7.
442. Crooks G. E., Hon G., Chandonia J. M., Brenner S. E. WebLogo: a sequence logo generator // *Genome Res.* – 2004. – Т. 14, № 6. – С. 1188-90.
443. Baker N. A., Sept D., Joseph S., Holst M. J., McCammon J. A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2001. – Т. 98, № 18. – С. 10037-41.
444. Krissinel E., Henrick K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state // *J Mol Biol.* – 2007. – Т. 372, № 3. – С. 774-97.
445. Xiao B., Jones D., Madrazo J., Soneji Y., Aitken A., Gamblin S. Crystallization of a 14-3-3 protein // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 1996. – Т. 52, № Pt 1. – С. 203-6.
446. Jerius H., Karolyi D. R., Mondy J. S., Beall A., Wootton D., Ku D., Cable S., Brophy C. M. Endothelial-dependent vasodilation is associated with increases in the phosphorylation of a small heat shock protein (HSP20) // *J Vasc Surg.* – 1999. – Т. 29, № 4. – С. 678-84.
447. Flynn C. R., Komalavilas P., Tessier D., Thresher J., Niederkofler E. E., Dreiza C. M., Nelson R. W., Panitch A., Joshi L., Brophy C. M. Transduction of biologically active motifs of the small heat shock-related protein HSP20 leads to relaxation of vascular smooth muscle // *FASEB J.* – 2003. – Т. 17, № 10. – С. 1358-60.
448. Mymrikov E. V., Seit-Nebi A. S., Gusev N. B. Large potentials of small heat shock proteins // *Physiol Rev.* – 2011. – Т. 91, № 4. – С. 1123-59.
449. Kaiser C. J. O., Peters C., Schmid P. W. N., Stavropoulou M., Zou J., Dahiya V., Mymrikov E. V., Rockel B., Asami S., Haslbeck M., Rappsilber J., Reif B., Zacharias M., Buchner J., Weinkauff S. The structure and oxidation of the eye lens chaperone alphaA-crystallin // *Nat Struct Mol Biol.* – 2019. – Т. 26, № 12. – С. 1141-1150.

450. Arrigo A. P. Analysis of HspB1 (Hsp27) Oligomerization and Phosphorylation Patterns and Its Interaction with Specific Client Polypeptides // *Methods Mol Biol.* – 2018. – T. 1709. – C. 163-178.
451. Rutsdottir G., Harmark J., Weide Y., Hebert H., Rasmussen M. I., Wernersson S., Respondek M., Akke M., Hojrup P., Koeck P. J. B., Soderberg C. A. G., Emanuelsson C. Structural model of dodecameric heat-shock protein Hsp21: Flexible N-terminal arms interact with client proteins while C-terminal tails maintain the dodecamer and chaperone activity // *J Biol Chem.* – 2017. – T. 292, № 19. – C. 8103-8121.
452. Aquilina J. A., Benesch J. L., Bateman O. A., Slingsby C., 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. – T. 100, № 19. – C. 10611-6.
453. Jehle S., van Rossum B., Stout J. R., Noguchi S. M., Falber K., Rehbein K., Oschkinat H., Klevit R. E., Rajagopal P. alphaB-crystallin: a hybrid solid-state/solution-state NMR investigation reveals structural aspects of the heterogeneous oligomer // *J Mol Biol.* – 2009. – T. 385, № 5. – C. 1481-97.
454. <http://www.softscientific.com/science/WhitePapers/dynals1/dynals100.htm>. –
455. Chebotareva N. A., Eronina T. B., Sluchanko N. N., Kurganov B. I. Effect of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions on oligomeric state and chaperone-like activity of alphaB-crystallin in crowded media // *Int J Biol Macromol.* – 2015. – T. 76. – C. 86-93.
456. Gu L., Abulimiti A., Li W., Chang Z. Monodisperse Hsp16.3 nonamer exhibits dynamic dissociation and reassociation, with the nonamer dissociation prerequisite for chaperone-like activity // *J Mol Biol.* – 2002. – T. 319, № 2. – C. 517-26.
457. Weeks S. D., Muranova L. K., Heirbaut M., Beelen S., Strelkov S. V., Gusev N. B. Characterization of human small heat shock protein HSPB1 alpha-crystallin domain localized mutants associated with hereditary motor neuron diseases // *Sci Rep.* – 2018. – T. 8, № 1. – C. 688.
458. Haslbeck M., Weinkauff S., Buchner J. Small heat shock proteins: Simplicity meets complexity // *J Biol Chem.* – 2019. – T. 294, № 6. – C. 2121-2132.
459. Datskevich P. N., Gusev N. B. Structure and properties of chimeric small heat shock proteins containing yellow fluorescent protein attached to their C-terminal ends // *Cell Stress Chaperones.* – 2014. – T. 19, № 4. – C. 507-18.
460. Sun Y., MacRae T. H. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function // *Cell Mol Life Sci.* – 2005. – T. 62, № 21. – C. 2460-76.

461. Erickson H. P. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy // *Biol Proced Online*. – 2009. – T. 11. – C. 32-51.
462. Burt C. T., Glonek T., Barany M. Analysis of living tissue by phosphorus-31 magnetic resonance // *Science*. – 1977. – T. 195, № 4274. – C. 145-9.
463. Dawson M. J., Gadian D. G., Wilkie D. R. Mechanical relaxation rate and metabolism studied in fatiguing muscle by phosphorus nuclear magnetic resonance // *J Physiol*. – 1980. – T. 299. – C. 465-84.
464. Bustad H. J., Skjaerven L., Ying M., Halskau O., Baumann A., Rodriguez-Larrea D., Costas M., Underhaug J., Sanchez-Ruiz J. M., Martinez A. The peripheral binding of 14-3-3gamma to membranes involves isoform-specific histidine residues // *PLoS One*. – 2012. – T. 7, № 11. – C. e49671.
465. Athwal G. S., Huber J. L., Huber S. C. Phosphorylated nitrate reductase and 14-3-3 proteins. Site of interaction, effects of ions, and evidence for an amp-binding site on 14-3-3 proteins // *Plant Physiol*. – 1998. – T. 118, № 3. – C. 1041-8.
466. Pozdeyev N., Taylor C., Haque R., Chaurasia S. S., Visser A., Thazyeen A., Du Y., Fu H., Weller J., Klein D. C., Iuvone P. M. Photic regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase binding to 14-3-3 proteins in retinal photoreceptor cells // *J Neurosci*. – 2006. – T. 26, № 36. – C. 9153-61.
467. Koretsune Y., Corretti M. C., Kusuoka H., Marban E. Mechanism of early ischemic contractile failure. Inexcitability, metabolite accumulation, or vascular collapse? // *Circ Res*. – 1991. – T. 68, № 1. – C. 255-62.
468. Iralde-Lorente L., Tassone G., Clementi L., Franci L., Munier C. C., Cau Y., Mori M., Chiariello M., Angelucci A., Perry M. W. D., Pozzi C., Mangani S., Botta M. Identification of Phosphate-Containing Compounds as New Inhibitors of 14-3-3/c-Abl Protein-Protein Interaction // *ACS Chem Biol*. – 2020. – T. 15, № 4. – C. 1026-1035.
469. Bustos D. M., Iglesias A. A. A model for the interaction between plant GAPN and 14-3-3zeta using protein-protein docking calculations, electrostatic potentials and kinetics // *J Mol Graph Model*. – 2005. – T. 23, № 6. – C. 490-502.
470. Horie M., Suzuki M., Takahashi E., Tanigami A. Cloning, expression, and chromosomal mapping of the human 14-3-3gamma gene (YWHAG) to 7q11.23 // *Genomics*. – 1999. – T. 60, № 2. – C. 241-3.

471. Hu G., Li H., Liu J. Y., Wang J. Insight into conformational change for 14-3-3sigma protein by molecular dynamics simulation // *Int J Mol Sci.* – 2014. – T. 15, № 2. – C. 2794-810.
472. Silverstein R., Rawitch A. B., Grainger D. A. Affinity labeling of phosphoenolpyruvate carboxykinase with 1, 5-I-AEDANS // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1979. – T. 87, № 3. – C. 911-8.
473. Frieden C., Lieberman D., Gilbert H. R. A fluorescent probe for conformational changes in skeletal muscle G-actin // *J Biol Chem.* – 1980. – T. 255, № 19. – C. 8991-3.
474. Feil R., Bigl M., Ruth P., Hofmann F. Expression of cGMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli* // *Mol Cell Biochem.* – 1993. – T. 127-128. – C. 71-80.
475. Goldschmidt L., Cooper D. R., Derewenda Z. S., Eisenberg D. SERP Server. – 2007. – URL: <http://services.mbi.ucla.edu/SER/>.
476. 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., Laganowsky A. The structured core domain of alphaB-crystallin can prevent amyloid fibrillation and associated toxicity // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2014. – T. 111, № 16. – C. E1562-70.
477. Jehle S., Rajagopal P., Bardiaux B., Markovic S., Kuhne R., Stout J. R., Higman V. A., Klevit R. E., van Rossum B. J., Oschkinat H. Solid-state NMR and SAXS studies provide a structural basis for the activation of alphaB-crystallin oligomers // *Nat Struct Mol Biol.* – 2010. – T. 17, № 9. – C. 1037-42.
478. Clark A. R., Vree Egberts W., Kondrat F. D. L., Hilton G. R., Ray N. J., Cole A. R., Carver J. A., Benesch J. L. P., Keep N. H., Boelens W. C., Slingsby C. Terminal Regions Confer Plasticity to the Tetrameric Assembly of Human HspB2 and HspB3 // *J Mol Biol.* – 2018. – T. 430, № 18 Pt B. – C. 3297-3310.
479. Freilich R., Betegon M., Tse E., Mok S. A., Julien O., Agard D. A., Southworth D. R., Takeuchi K., Gestwicki J. E. Competing protein-protein interactions regulate binding of Hsp27 to its client protein tau // *Nat Commun.* – 2018. – T. 9, № 1. – C. 4563.
480. Heirbaut M., Beelen S., Strelkov S. V., Weeks S. D. Dissecting the functional role of the N-terminal domain of the human small heat shock protein HSPB6 // *PLoS One.* – 2014. – T. 9, № 8. – C. e105892.
481. Heirbaut M., Lermyte F., Martin E. M., Beelen S., Sobott F., Strelkov S. V., Weeks S. D. Specific sequences in the N-terminal domain of human small heat-shock protein HSPB6 dictate preferential hetero-oligomerization with the orthologue HSPB1 // *J Biol Chem.* – 2017. – T. 292, № 24. – C. 9944-9957.

482. Bah A., Forman-Kay J. D. Modulation of Intrinsically Disordered Protein Function by Post-translational Modifications // *J Biol Chem.* – 2016. – T. 291, № 13. – C. 6696-705.
483. Bah A., Vernon R. M., Siddiqui Z., Krzeminski M., Muhandiram R., Zhao C., Sonenberg N., Kay L. E., Forman-Kay J. D. Folding of an intrinsically disordered protein by phosphorylation as a regulatory switch // *Nature.* – 2015. – T. 519, № 7541. – C. 106-9.
484. Lee C. W., Ferreon J. C., Ferreon A. C., Arai M., Wright P. E. Graded enhancement of p53 binding to CREB-binding protein (CBP) by multisite phosphorylation // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – T. 107, № 45. – C. 19290-5.
485. Tompa P., Schad E., Tantos A., Kalmar L. Intrinsically disordered proteins: emerging interaction specialists // *Curr Opin Struct Biol.* – 2015. – T. 35. – C. 49-59.
486. Everything but the ACD, Functional Conservation of the Non-conserved Terminal Regions in sHSPs. Heat Shock Proteins: The Big Book on Small Heat Shock Proteins. / Heirbaut M., Strelkov S. V., Weeks S. D.: Springer International Publishing, 2015. Heat Shock Proteins: The Big Book on Small Heat Shock Proteins.
487. Carra S., Alberti S., Arrigo P. A., Benesch J. L., Benjamin I. J., Boelens W., Bartelt-Kirbach B., Brundel B., Buchner J., Bukau B., Carver J. A., Ecroyd H., Emanuelsson C., Finet S., Golenhofen N., Goloubinoff P., Gusev N., Haslbeck M., Hightower L. E., Kampinga H. H., Klevit R. E., Liberek K., McHaourab H. S., McMenimen K. A., Poletti A., Quinlan R., Strelkov S. V., Toth M. E., Vierling E., Tanguay R. M. The growing world of small heat shock proteins: from structure to functions // *Cell Stress Chaperones.* – 2017. – T. 22, № 4. – C. 601-611.
488. Baughman H. E. R., Pham T. T., Adams C. S., Nath A., Klevit R. E. Release of a disordered domain enhances HspB1 chaperone activity toward tau // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2020. – T. 117, № 6. – C. 2923-2929.
489. Wright P. E., Dyson H. J. Linking folding and binding // *Curr Opin Struct Biol.* – 2009. – T. 19, № 1. – C. 31-8.
490. Flock T., Weatheritt R. J., Latysheva N. S., Babu M. M. Controlling entropy to tune the functions of intrinsically disordered regions // *Curr Opin Struct Biol.* – 2014. – T. 26. – C. 62-72.
491. Mainz A., Peschek J., Stavropoulou M., Back K. C., Bardiaux B., Asami S., Prade E., Peters C., Weinkauff S., Buchner J., Reif B. The chaperone alphaB-crystallin uses different interfaces to capture an amorphous and an amyloid client // *Nat Struct Mol Biol.* – 2015. – T. 22, № 11. – C. 898-905.

492. Hanazono Y., Takeda K., Oka T., Abe T., Tomonari T., Akiyama N., Aikawa Y., Yohda M., Miki K. Nonequivalence observed for the 16-meric structure of a small heat shock protein, SpHsp16.0, from *Schizosaccharomyces pombe* // *Structure*. – 2013. – T. 21, № 2. – C. 220-8.
493. van Montfort R. L., Basha E., Friedrich K. L., Slingsby C., Vierling E. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein // *Nat Struct Biol*. – 2001. – T. 8, № 12. – C. 1025-30.
494. Heirbaut M., Lermyte F., Martin E. M., Beelen S., Verschueren T., Sobott F., Strelkov S. V., Weeks S. D. The preferential heterodimerization of human small heat shock proteins HSPB1 and HSPB6 is dictated by the N-terminal domain // *Arch Biochem Biophys*. – 2016. – T. 610. – C. 41-50.
495. Makley L. N., McMenimen K. A., DeVree B. T., Goldman J. W., McGlasson B. N., Rajagopal P., Duniyak B. M., McQuade T. J., Thompson A. D., Sunahara R., Klevit R. E., Andley U. P., Gestwicki J. E. Pharmacological chaperone for alpha-crystallin partially restores transparency in cataract models // *Science*. – 2015. – T. 350, № 6261. – C. 674-7.
496. Hussein H. A., Borrel A., Geneix C., Petitjean M., Regad L., Camproux A. C. PockDrug-Server: a new web server for predicting pocket druggability on holo and apo proteins // *Nucleic Acids Res*. – 2015. – T. 43, № W1. – C. W436-42.
497. Bier D., Bartel M., Sies K., Halbach S., Higuchi Y., Haranosono Y., Brummer T., Kato N., Ottmann C. Small-Molecule Stabilization of the 14-3-3/Gab2 Protein-Protein Interaction (PPI) Interface // *ChemMedChem*. – 2016. – T. 11, № 8. – C. 911-8.
498. Bustos D. M. The role of protein disorder in the 14-3-3 interaction network // *Mol Biosyst*. – 2012. – T. 8, № 1. – C. 178-84.
499. Sluchanko N. N., Bustos D. M. Intrinsic disorder associated with 14-3-3 proteins and their partners // *Prog Mol Biol Transl Sci*. – 2019. – T. 166. – C. 19-61.
500. Uhart M., Bustos D. M. Protein intrinsic disorder and network connectivity. The case of 14-3-3 proteins // *Front Genet*. – 2014. – T. 5. – C. 10.
501. Uhart M., Flores G., Bustos D. M. Controllability of protein-protein interaction phosphorylation-based networks: Participation of the hub 14-3-3 protein family // *Sci Rep*. – 2016. – T. 6. – C. 26234.
502. Tsvetkov P. O., Makarov A. A., Malesinski S., Peyrot V., Devred F. New insights into tau-microtubules interaction revealed by isothermal titration calorimetry // *Biochimie*. – 2012. – T. 94, № 3. – C. 916-9.

503. Johnson G. V., Stoothoff W. H. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction // *J Cell Sci.* – 2004. – T. 117, № 24. – C. 5721-5729.
504. Schneider A., Biernat J., von Bergen M., Mandelkow E., Mandelkow E. M. Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments // *Biochemistry.* – 1999. – T. 38, № 12. – C. 3549-3558.
505. Avila J., Perez M., Lim F., Gomez-Ramos A., Hernandez F., Lucas J. J. Tau in neurodegenerative diseases: tau phosphorylation and assembly // *Neurotox Res.* – 2004. – T. 6, № 6. – C. 477-82.
506. Iqbal K., Alonso Adel C., Chen S., Chohan M. O., El-Akkad E., Gong C. X., Khatoon S., Li B., Liu F., Rahman A., Tanimukai H., Grundke-Iqbal I. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies // *Biochim Biophys Acta.* – 2005. – T. 1739, № 2-3. – C. 198-210.
507. Wang J. Z., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration // *Eur J Neurosci.* – 2007. – T. 25, № 1. – C. 59-68.
508. Kemp B. E., Graves D. J., Benjamini E., Krebs E. G. Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase // *J Biol Chem.* – 1977. – T. 252, № 14. – C. 4888-94.
509. Shabb J. B. Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase // *Chem Rev.* – 2001. – T. 101, № 8. – C. 2381-411.
510. Cheng X., Ma Y., Moore M., Hemmings B. A., Taylor S. S. Phosphorylation and activation of cAMP-dependent protein kinase by phosphoinositide-dependent protein kinase // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – T. 95, № 17. – C. 9849-54.
511. Scott C. W., Spreen R. C., Herman J. L., Chow F. P., Davison M. D., Young J., Caputo C. B. Phosphorylation of recombinant tau by cAMP-dependent protein kinase. Identification of phosphorylation sites and effect on microtubule assembly // *J Biol Chem.* – 1993. – T. 268, № 2. – C. 1166-1173.
512. Hashiguchi M., Sobue K., Paudel H. K. 14-3-3zeta is an effector of tau protein phosphorylation // *J Biol Chem.* – 2000. – T. 275, № 33. – C. 25247-54.
513. Joo Y., Schumacher B., Landrieu I., Bartel M., Smet-Nocca C., Jang A., Choi H. S., Jeon N. L., Chang K. A., Kim H. S., Ottmann C., Suh Y. H. Involvement of 14-3-3 in tubulin instability and impaired axon development is mediated by Tau // *FASEB J.* – 2015. – T. 29, № 10. – C. 4133-44.

514. Shen Y., Godlewski J., Bronisz A., Zhu J., Comb M., Avruch J., Tzivion G. Significance of 14-3-3 self-dimerization for phosphorylation-dependent target binding // *Mol Biol Cell.* – 2003. – T. 14, № 11. – C. 4721-4733.
515. Steinacker P., Aitken A., Otto M. 14-3-3 proteins in neurodegeneration // *Semin Cell Dev Biol.* – 2011. – T. 22, № 7. – C. 696-704.
516. Umahara T., Uchihara T., Tsuchiya K., Nakamura A., Ikeda K., Iwamoto T., Takasaki M. Immunolocalization of 14-3-3 isoforms in brains with Pick body disease // *Neurosci Lett.* – 2004. – T. 371, № 2-3. – C. 215-9.
517. Mukrasch M. D., Bibow S., Korukottu J., Jegannathan S., Biernat J., Griesinger C., Mandelkow E., Zweckstetter M. Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution // *PLoS Biol.* – 2009. – T. 7, № 2. – C. e34.
518. Shkumatov A. V., Chinnathambi S., Mandelkow E., Svergun D. I. Structural memory of natively unfolded tau protein detected by small-angle X-ray scattering // *Proteins.* – 2011. – T. 79, № 7. – C. 2122-31.
519. Mercken M., Grynspan F., Nixon R. A. Differential sensitivity to proteolysis by brain calpain of adult human tau, fetal human tau and PHF-tau // *FEBS Lett.* – 1995. – T. 368, № 1. – C. 10-4.
520. Volke D., Hoffmann R. Purification of bovine Tau versions by affinity chromatography // *Protein Expr Purif.* – 2006. – T. 50, № 1. – C. 37-42.
521. Karikari T. K., Turner A., Stass R., Lee L. C., Wilson B., Nagel D. A., Hill E. J., Moffat K. G. Expression and purification of tau protein and its frontotemporal dementia variants using a cleavable histidine tag // *Protein Expr Purif.* – 2017. – T. 130. – C. 44-54.
522. Jicha G. A., O'Donnell A., Weaver C., Angeletti R., Davies P. Hierarchical phosphorylation of recombinant tau by the paired-helical filament-associated protein kinase is dependent on cyclic AMP-dependent protein kinase // *J Neurochem.* – 1999. – T. 72, № 1. – C. 214-24.
523. Rodriguez-Martin T., Cuchillo-Ibanez I., Noble W., Nyenya F., Anderton B. H., Hanger D. P. Tau phosphorylation affects its axonal transport and degradation // *Neurobiol Aging.* – 2013. – T. 34, № 9. – C. 2146-57.
524. Amano M., Kaneko T., Maeda A., Nakayama M., Ito M., Yamauchi T., Goto H., Fukata Y., Oshiro N., Shinohara A., Iwamatsu A., Kaibuchi K. Identification of Tau and MAP2 as novel substrates of Rho-kinase and myosin phosphatase // *J Neurochem.* – 2003. – T. 87, № 3. – C. 780-90.

525. Reynolds C. H., Betts J. C., Blackstock W. P., Nebreda A. R., Anderton B. H. Phosphorylation sites on tau identified by nanoelectrospray mass spectrometry: differences in vitro between the mitogen-activated protein kinases ERK2, c-Jun N-terminal kinase and P38, and glycogen synthase kinase-3beta // *J Neurochem.* – 2000. – T. 74, № 4. – C. 1587-95.
526. Papanikolopoulou K., Kosmidis S., Grammenoudi S., Skoulakis E. M. Phosphorylation differentiates tau-dependent neuronal toxicity and dysfunction // *Biochem Soc Trans.* – 2010. – T. 38, № 4. – C. 981-7.
527. Kosmidis S., Grammenoudi S., Papanikolopoulou K., Skoulakis E. M. Differential effects of Tau on the integrity and function of neurons essential for learning in *Drosophila* // *J Neurosci.* – 2010. – T. 30, № 2. – C. 464-77.
528. Schmandke A., Schmandke A., Strittmatter S. M. ROCK and Rho: biochemistry and neuronal functions of Rho-associated protein kinases // *Neuroscientist.* – 2007. – T. 13, № 5. – C. 454-69.
529. Mukrasch M. D., von Bergen M., Biernat J., Fischer D., Griesinger C., Mandelkow E., Zweckstetter M. The "jaws" of the tau-microtubule interaction // *J Biol Chem.* – 2007. – T. 282, № 16. – C. 12230-9.
530. Umahara T., Uchihara T., Tsuchiya K., Nakamura A., Iwamoto T., Ikeda K., Takasaki M. 14-3-3 proteins and zeta isoform containing neurofibrillary tangles in patients with Alzheimer's disease // *Acta neuropathologica.* – 2004. – T. 108, № 4. – C. 279-286.
531. Jansen S., Melkova K., Trosanova Z., Hanakova K., Zachrdla M., Novacek J., Zupa E., Zdrahal Z., Hritz J., Zidek L. Quantitative mapping of microtubule-associated protein 2c (MAP2c) phosphorylation and regulatory protein 14-3-3zeta-binding sites reveals key differences between MAP2c and its homolog Tau // *J Biol Chem.* – 2017. – T. 292, № 16. – C. 6715-6727.
532. Zhu P., Gafken P. R., Mehl R. A., Cooley R. B. A Highly Versatile Expression System for the Production of Multiply Phosphorylated Proteins // *ACS Chem Biol.* – 2019. – T. 14, № 7. – C. 1564-1572.
533. Barber K. W., Muir P., Szeligowski R. V., Rogulina S., Gerstein M., Sampson J. R., Isaacs F. J., Rinehart J. Encoding human serine phosphopeptides in bacteria for proteome-wide identification of phosphorylation-dependent interactions // *Nat Biotechnol.* – 2018. – T. 36, № 7. – C. 638-644.
534. Miller W. L. Mechanism of StAR's regulation of mitochondrial cholesterol import // *Mol Cell Endocrinol.* – 2007. – T. 265-266. – C. 46-50.

535. Tugaeva K. V., Sluchanko N. N. Steroidogenic Acute Regulatory Protein: Structure, Functioning, and Regulation // *Biochemistry (Mosc)*. – 2019. – T. 84, № Suppl 1. – C. S233-S253.
536. Clark B. J., Wells J., King S. R., Stocco D. M. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) // *J Biol Chem*. – 1994. – T. 269, № 45. – C. 28314-22.
537. Stocco D. M. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis // *Annu Rev Physiol*. – 2001. – T. 63. – C. 193-213.
538. Barbar E., Lavigne P., Lehoux J. G. Validation of the mechanism of cholesterol binding by StAR using short molecular dynamics simulations // *J Steroid Biochem Mol Biol*. – 2009. – T. 113, № 1-2. – C. 92-7.
539. Bose H. S., Baldwin M. A., Miller W. L. Incorrect folding of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in congenital lipid adrenal hyperplasia // *Biochemistry*. – 1998. – T. 37, № 27. – C. 9768-75.
540. Tsujishita Y., Hurley J. H. Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain // *Nat Struct Biol*. – 2000. – T. 7, № 5. – C. 408-14.
541. Thorsell A. G., Lee W. H., Persson C., Siponen M. I., Nilsson M., Busam R. D., Kotenyova T., Schuler H., Lehtio L. Comparative structural analysis of lipid binding START domains // *PLoS One*. – 2011. – T. 6, № 6. – C. e19521.
542. Arakane F., King S. R., Du Y., Kallen C. B., Walsh L. P., Watari H., Stocco D. M., Strauss J. F., 3rd. Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity // *J Biol Chem*. – 1997. – T. 272, № 51. – C. 32656-62.
543. Saline M., Badertscher L., Wolter M., Lau R., Gunnarsson A., Jacso T., Norris T., Ottmann C., Snijder A. AMPK and AKT protein kinases hierarchically phosphorylate the N-terminus of the FOXO1 transcription factor, modulating interactions with 14-3-3 proteins // *J Biol Chem*. – 2019. – T. 294, № 35. – C. 13106-13116.
544. Tugaeva K. V., Titterington J., Sotnikov D. V., Maksimov E. G., Antson A. A., Sluchanko N. N. Molecular basis for the recognition of steroidogenic acute regulatory protein by the 14-3-3 protein family // *FEBS J*. – 2020.10.1111/febs.15474. – C. 10.1111/febs.15474.
545. Ding S., Zhou R., Zhu Y. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the chimeric protein LKB1-14-3-3zeta // *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. – 2013. – T. 69, № Pt 12. – C. 1371-3.

546. Ding S., Zhou R., Zhu Y. Structure of the 14-3-3zeta-LKB1 fusion protein provides insight into a novel ligand-binding mode of 14-3-3 // *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* – 2015. – T. 71, № Pt 9. – C. 1114-9.
547. Klein D. C., Ganguly S., Coon S., Weller J. L., Obsil T., Hickman A., Dyda F. 14-3-3 Proteins and photoneuroendocrine transduction: role in controlling the daily rhythm in melatonin // *Biochem Soc Trans.* – 2002. – T. 30, № 4. – C. 365-73.
548. Stevers L. M., de Vink P. J., Ottmann C., Huskens J., Brunsveld L. A Thermodynamic Model for Multivalency in 14-3-3 Protein-Protein Interactions // *J Am Chem Soc.* – 2018. – T. 140, № 43. – C. 14498-14510.
549. Xu X., Lemmens L. J. M., den Hamer A., Merckx M., Ottmann C., Brunsveld L. Modular bioengineered kinase sensors via scaffold protein-mediated split-luciferase complementation // *Chem Sci.* – 2020. – T. 11, № 21. – C. 5532-5536.
550. Garcia De La Torre J., Huertas M. L., Carrasco B. Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure // *Biophys J.* – 2000. – T. 78, № 2. – C. 719-30.
551. Coblitz B., Shikano S., Wu M., Gabelli S., Cockrell L., Spieker M., Hanyu Y., Fu H., Amzel M., Li M. C-terminal recognition by 14-3-3 proteins for surface expression of membrane receptors // *The Journal of biological chemistry.* – 2005. – T. 280, № 43. – C. 36263-36272.
552. Aghazadeh Y., Papadopoulos V. The role of the 14-3-3 protein family in health, disease, and drug development // *Drug Discov Today.* – 2016. – T. 21, № 2. – C. 278-87.
553. Aghazadeh Y., Venugopal S., Martinez-Arguelles D. B., Boisvert A., Blonder J., Papadopoulos V. Identification of Sec23ip, Part of 14-3-3 γ Protein Network, as a Regulator of Acute Steroidogenesis in MA-10 Leydig Cells // *Endocrinology.* – 2020. – T. 161, № 2.
554. Qi X. J., Wildey G. M., Howe P. H. Evidence that Ser87 of BimEL is phosphorylated by Akt and regulates BimEL apoptotic function // *J Biol Chem.* – 2006. – T. 281, № 2. – C. 813-23.
555. Chalupska D., Rozycki B., Humpolickova J., Faltova L., Klima M., Boura E. Phosphatidylinositol 4-kinase IIIbeta (PI4KB) forms highly flexible heterocomplexes that include ACBD3, 14-3-3, and Rab11 proteins // *Sci Rep.* – 2019. – T. 9, № 1. – C. 567.
556. Laflamme C., Galan J. A., Ben El Kadhi K., Meant A., Zeledon C., Carreno S., Roux P. P., Emery G. Proteomics Screen Identifies Class I Rab11 Family Interacting Proteins as Key Regulators of Cytokinesis // *Mol Cell Biol.* – 2017. – T. 37, № 3.

557. Astuti P., Boutros R., Ducommun B., Gabrielli B. Mitotic phosphorylation of Cdc25B Ser321 disrupts 14-3-3 binding to the high affinity Ser323 site // *J Biol Chem.* – 2010. – T. 285, № 45. – C. 34364-70.
558. Arakane F., Kallen C. B., Watari H., Foster J. A., Sepuri N. B., Pain D., Stayrook S. E., Lewis M., Gerton G. L., Strauss J. F., 3rd. The mechanism of action of steroidogenic acute regulatory protein (StAR). StAR acts on the outside of mitochondria to stimulate steroidogenesis // *J Biol Chem.* – 1998. – T. 273, № 26. – C. 16339-45.
559. Bose H. S., Whittal R. M., Bose M., Debnath D. Hydrophobic core of the steroidogenic acute regulatory protein for cholesterol transport // *Biochemistry.* – 2009. – T. 48, № 6. – C. 1198-209.
560. Kim K., Min J., Kirby T. W., Gabel S. A., Pedersen L. C., London R. E. Ligand binding characteristics of the Ku80 von Willebrand domain // *DNA Repair (Amst).* – 2020. – T. 85. – C. 102739.
561. Kaplan A., Andrei S. A., van Regteren Altena A., Simas T., Banerjee S. L., Kato N., Bisson N., Higuchi Y., Ottmann C., Fournier A. E. Polypharmacological Perturbation of the 14-3-3 Adaptor Protein Interactome Stimulates Neurite Outgrowth // *Cell Chem Biol.* – 2020. – T. 27, № 6. – C. 657-667 e6.
562. Zhang J., Ma Y., Taylor S. S., Tsien R. Y. Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2001. – T. 98, № 26. – C. 14997-5002.
563. Zhang L., Takahashi Y., Hsu P. K., Kollist H., Merilo E., Krysan P. J., Schroeder J. I. FRET kinase sensor development reveals SnRK2/OST1 activation by ABA but not by MeJA and high CO₂ during stomatal closure // *Elife.* – 2020. – T. 9.
564. Xu X., Lemmens L. J. M., den Hamer A., Merckx M., Ottmann C., Brunsveld L. Modular bioengineered kinase sensors via scaffold protein-mediated split-luciferase complementation // *Chemical Science.* – 2020. – T. 11, № 21. – C. 5532-5536.
565. Timm T., von Kries J. P., Li X., Zempel H., Mandelkow E., Mandelkow E. M. Microtubule affinity regulating kinase activity in living neurons was examined by a genetically encoded fluorescence resonance energy transfer/fluorescence lifetime imaging-based biosensor: inhibitors with therapeutic potential // *J Biol Chem.* – 2011. – T. 286, № 48. – C. 41711-22.
566. Ottmann C., Yasmin L., Weyand M., Veesenmeyer J., Diaz M., Palmer R., Francis M., Hauser A., Wittinghofer A., Hallberg B. Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 and

- exoenzyme S: from structure to pathogenesis // *The EMBO journal*. – 2007. – T. 26, № 3. – C. 902-913.
567. Harada H., Becknell B., Wilm M., Mann M., Huang L. J., Taylor S. S., Scott J. D., Korsmeyer S. J. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A // *Mol Cell*. – 1999. – T. 3, № 4. – C. 413-22.
568. Schurmann A., Mooney A. F., Sanders L. C., Sells M. A., Wang H. G., Reed J. C., Bokoch G. M. p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis // *Mol Cell Biol*. – 2000. – T. 20, № 2. – C. 453-61.
569. Datta S. R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., Greenberg M. E. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery // *Cell*. – 1997. – T. 91, № 2. – C. 231-41.
570. del Peso L., Gonzalez-Garcia M., Page C., Herrera R., Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt // *Science*. – 1997. – T. 278, № 5338. – C. 687-9.
571. Tan Y., Ruan H., Demeter M. R., Comb M. J. p90(RSK) blocks bad-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway // *J Biol Chem*. – 1999. – T. 274, № 49. – C. 34859-67.
572. Fan J., Xu G., Nagel D. J., Hua Z., Zhang N., Yin G. A model of ischemia and reperfusion increases JNK activity, inhibits the association of BAD and 14-3-3, and induces apoptosis of rabbit spinal neurocytes // *Neurosci Lett*. – 2010. – T. 473, № 3. – C. 196-201.
573. Tan Y., Demeter M. R., Ruan H., Comb M. J. BAD Ser-155 phosphorylation regulates BAD/Bcl-XL interaction and cell survival // *J Biol Chem*. – 2000. – T. 275, № 33. – C. 25865-9.
574. Han J. Y., Jeong E. Y., Kim Y. S., Roh G. S., Kim H. J., Kang S. S., Cho G. J., Choi W. S. C-jun N-terminal kinase regulates the interaction between 14-3-3 and Bad in ethanol-induced cell death // *J Neurosci Res*. – 2008. – T. 86, № 14. – C. 3221-9.
575. Humphrey R. G., Sonnenberg-Hirche C., Smith S. D., Hu C., Barton A., Sadovsky Y., Nelson D. M. Epidermal growth factor abrogates hypoxia-induced apoptosis in cultured human trophoblasts through phosphorylation of BAD Serine 112 // *Endocrinology*. – 2008. – T. 149, № 5. – C. 2131-7.
576. Masters S. C., Yang H., Datta S. R., Greenberg M. E., Fu H. 14-3-3 inhibits Bad-induced cell death through interaction with serine-136 // *Mol Pharmacol*. – 2001. – T. 60, № 6. – C. 1325-31.

577. Meller R., Schindler C. K., Chu X. P., Xiong Z. G., Cameron J. A., Simon R. P., Henshall D. C. Seizure-like activity leads to the release of BAD from 14-3-3 protein and cell death in hippocampal neurons in vitro // *Cell Death Differ.* – 2003. – T. 10, № 5. – C. 539-47.
578. Chang C. Y., Shen C. C., Su H. L., Chen C. J. Gefitinib induces apoptosis in human glioma cells by targeting Bad phosphorylation // *J Neurooncol.* – 2011. – T. 105, № 3. – C. 507-22.
579. Xiao D., Singh S. V. Diallyl trisulfide, a constituent of processed garlic, inactivates Akt to trigger mitochondrial translocation of BAD and caspase-mediated apoptosis in human prostate cancer cells // *Carcinogenesis.* – 2006. – T. 27, № 3. – C. 533-40.
580. Yang X., Luo C., Cai J., Pierce W. M., Tezel G. Phosphorylation-dependent interaction with 14-3-3 in the regulation of bad trafficking in retinal ganglion cells // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2008. – T. 49, № 6. – C. 2483-94.
581. Bui N. L., Pandey V., Zhu T., Ma L., Basappa, Lobie P. E. Bad phosphorylation as a target of inhibition in oncology // *Cancer Lett.* – 2018. – T. 415. – C. 177-186.
582. Hayakawa J., Ohmichi M., Kurachi H., Kanda Y., Hisamoto K., Nishio Y., Adachi K., Tasaka K., Kanzaki T., Murata Y. Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin // *Cancer Res.* – 2000. – T. 60, № 21. – C. 5988-94.
583. Pandey V., Wang B., Mohan C. D., Raquib A. R., Rangappa S., Srinivasa V., Fuchs J. E., Girish K. S., Zhu T., Bender A., Ma L., Yin Z., Basappa, Rangappa K. S., Lobie P. E. Discovery of a small-molecule inhibitor of specific serine residue BAD phosphorylation // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2018. – T. 115, № 44. – C. E10505-E10514.
584. Masters S. C., Fu H. 14-3-3 proteins mediate an essential anti-apoptotic signal // *J Biol Chem.* – 2001. – T. 276, № 48. – C. 45193-200.
585. Hinds M. G., Smits C., Fredericks-Short R., Risk J. M., Bailey M., Huang D. C., Day C. L. Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets // *Cell Death Differ.* – 2007. – T. 14, № 1. – C. 128-36.
586. Masuda Y., Saeki Y., Arai N., Kawai H., Kukimoto I., Tanaka K., Masutani C. Stepwise multipolyubiquitination of p53 by the E6AP-E6 ubiquitin ligase complex // *J Biol Chem.* – 2019. – T. 294, № 41. – C. 14860-14875.
587. Vats A., Thatte J., Banks L. Identification of E6AP-independent degradation targets of HPV E6 // *J Gen Virol.* – 2019. – T. 100, № 12. – C. 1674-1679.

588. Basukala O., Sarabia-Vega V., Banks L. Human papillomavirus oncoproteins and post-translational modifications: generating multifunctional hubs for overriding cellular homeostasis // *Biol Chem.* – 2020. – T. 401, № 5. – C. 585-599.
589. Bosch F. X., Burchell A. N., Schiffman M., Giuliano A. R., de Sanjose S., Bruni L., Tortolero-Luna G., Kjaer S. K., Munoz N. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia // *Vaccine.* – 2008. – T. 26 Suppl 10. – C. K1-16.
590. Celegato M., Messa L., Goracci L., Mercorelli B., Bertagnin C., Spyraakis F., Suarez I., Cousido-Siah A., Trave G., Banks L., Cruciani G., Palu G., Loregian A. A novel small-molecule inhibitor of the human papillomavirus E6-p53 interaction that reactivates p53 function and blocks cancer cells growth // *Cancer Lett.* – 2020. – T. 470. – C. 115-125.
591. Kolluru S., Momoh R., Lin L., Mallareddy J. R., Krstenansky J. L. Identification of potential binding pocket on viral oncoprotein HPV16 E6: a promising anti-cancer target for small molecule drug discovery // *BMC Mol Cell Biol.* – 2019. – T. 20, № 1. – C. 30.
592. Ramirez J., Poirson J., Foltz C., Chebaro Y., Schrappe M., Meyer A., Bonetta A., Forster A., Jacob Y., Masson M., Deryckere F., Trave G. Targeting the Two Oncogenic Functional Sites of the HPV E6 Oncoprotein with a High-Affinity Bivalent Ligand // *Angew Chem Int Ed Engl.* – 2015. – T. 54, № 27. – C. 7958-62.
593. Songyang Z., Fanning A. S., Fu C., Xu J., Marfatia S. M., Chishti A. H., Crompton A., Chan A. C., Anderson J. M., Cantley L. C. Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains // *Science.* – 1997. – T. 275, № 5296. – C. 73-7.
594. Delury C. P., Marsh E. K., James C. D., Boon S. S., Banks L., Knight G. L., Roberts S. The role of protein kinase A regulation of the E6 PDZ-binding domain during the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 18 // *J Virol.* – 2013. – T. 87, № 17. – C. 9463-72.
595. Kuhne C., Gardiol D., Guarnaccia C., Amenitsch H., Banks L. Differential regulation of human papillomavirus E6 by protein kinase A: conditional degradation of human discs large protein by oncogenic E6 // *Oncogene.* – 2000. – T. 19, № 51. – C. 5884-91.
596. Gogl G., Jane P., Caillet-Saguy C., Kostmann C., Bich G., Cousido-Siah A., Nyitray L., Vincentelli R., Wolff N., Nomine Y., Sluchanko N. N., Trave G. Dual Specificity PDZ- and 14-3-3-Binding Motifs: A Structural and Interactomics Study // *Structure.* – 2020. – T. 28, № 7. – C. 747-759 e3.

597. Espejo A. B., Gao G., Black K., Gayatri S., Veland N., Kim J., Chen T., Sudol M., Walker C., Bedford M. T. PRMT5 C-terminal Phosphorylation Modulates a 14-3-3/PDZ Interaction Switch // *J Biol Chem.* – 2017. – T. 292, № 6. – C. 2255-2265.
598. <https://pave.niaid.nih.gov/>. –
599. Luck K., Charbonnier S., Trave G. The emerging contribution of sequence context to the specificity of protein interactions mediated by PDZ domains // *FEBS Lett.* – 2012. – T. 586, № 17. – C. 2648-61.
600. Thatte J., Massimi P., Thomas M., Boon S. S., Banks L. The Human Papillomavirus E6 PDZ Binding Motif Links DNA Damage Response Signaling to E6 Inhibition of p53 Transcriptional Activity // *J Virol.* – 2018. – T. 92, № 16.
601. Truong A., Masters S., Yang H., Fu H. Role of the 14-3-3 C-terminal loop in ligand interaction // *Proteins.* – 2002. – T. 49, № 3. – C. 321-325.
602. Wang M., Herrmann C. J., Simonovic M., Szklarczyk D., von Mering C. Version 4.0 of PaxDb: Protein abundance data, integrated across model organisms, tissues, and cell-lines // *Proteomics.* – 2015. – T. 15, № 18. – C. 3163-8.
603. Nomine Y., Masson M., Charbonnier S., Zanier K., Ristriani T., Deryckere F., Sibler A. P., Desplancq D., Atkinson R. A., Weiss E., Orfanoudakis G., Kieffer B., Trave G. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis // *Mol Cell.* – 2006. – T. 21, № 5. – C. 665-78.
604. Zanier K., Charbonnier S., Sidi A. O., McEwen A. G., Ferrario M. G., Poussin-Courmontagne P., Cura V., Brimer N., Babah K. O., Ansari T., Muller I., Stote R. H., Cavarelli J., Vande Pol S., Trave G. Structural basis for hijacking of cellular LxxLL motifs by papillomavirus E6 oncoproteins // *Science.* – 2013. – T. 339, № 6120. – C. 694-8.
605. Paiardini A., Aducci P., Cervoni L., Cutruzzola F., Di Lucente C., Janson G., Pascarella S., Rinaldo S., Visconti S., Camoni L. The phytotoxin fusicoccin differently regulates 14-3-3 proteins association to mode III targets // *IUBMB Life.* – 2014. – T. 66, № 1. – C. 52-62.
606. Camoni L., Visconti S., Aducci P. The phytotoxin fusicoccin, a selective stabilizer of 14-3-3 interactions? // *IUBMB Life.* – 2013. – T. 65, № 6. – C. 513-7.
607. Sengupta A., Liriano J., Miller B. G., Frederich J. H. Analysis of Interactions Stabilized by Fusicoccin A Reveals an Expanded Suite of Potential 14-3-3 Binding Partners // *ACS Chem Biol.* – 2020. – T. 15, № 2. – C. 305-310.
608. Ohkanda J., Kusumoto A., Punzalan L., Masuda R., Wang C., Parvatkar P., Akase D., Aida M., Uesugi M., Higuchi Y., Kato N. Structural Effects of Fusicoccin upon Upregulation of

- 14-3-3-Phospholigand Interaction and Cytotoxic Activity // Chemistry. – 2018. – T. 24, № 60. – C. 16066-16071.
609. De Vries-van Leeuwen I. J., da Costa Pereira D., Flach K. D., Piersma S. R., Haase C., Bier D., Yalcin Z., Michalides R., Feenstra K. A., Jimenez C. R., de Greef T. F., Brunsveld L., Ottmann C., Zwart W., de Boer A. H. Interaction of 14-3-3 proteins with the estrogen receptor alpha F domain provides a drug target interface // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2013. – T. 110, № 22. – C. 8894-9.
610. Doveston R. G., Kuusk A., Andrei S. A., Leysen S., Cao Q., Castaldi M. P., Hendricks A., Brunsveld L., Chen H., Boyd H., Ottmann C. Small-molecule stabilization of the p53 - 14-3-3 protein-protein interaction // FEBS Lett. – 2017. – T. 591, № 16. – C. 2449-2457.
611. Gao J., Xu D. Correlation between posttranslational modification and intrinsic disorder in protein // Pac Symp Biocomput. – 2012. – C. 94-103.
612. Wolter M., de Vink P., Neves J. F., Srdanović S., Higuchi Y., Kato N., Wilson A., Landrieu I., Brunsveld L., Ottmann C. Selectivity via Cooperativity: Preferential Stabilization of the p65/14-3-3 Interaction with Semisynthetic Natural Products // Journal of the American Chemical Society. – 2020. – T. 142, № 27. – C. 11772-11783.
613. Wolter M., Santo D. L., Herman P., Ballone A., Centorrino F., Obsil T., Ottmann C. Interaction of an IkappaBalpha Peptide with 14-3-3 // ACS Omega. – 2020. – T. 5, № 10. – C. 5380-5388.
614. Ballone A., Centorrino F., Wolter M., Ottmann C. Structural characterization of 14-3-3zeta in complex with the human Son of sevenless homolog 1 (SOS1) // J Struct Biol. – 2018. – T. 202, № 3. – C. 210-215.
615. Veisova D., Macakova E., Rezaczkova L., Sulc M., Vacha P., Sychrova H., Obsil T., Obsilova V. Role of individual phosphorylation sites for the 14-3-3-protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1 // Biochemical Journal. – 2012. – T. 443, № 3. – C. 663-670.
616. Svergun D. I., Petoukhov M. V., Koch M. H. Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering // Biophys J. – 2001. – T. 80, № 6. – C. 2946-53.
617. Piiadov V., Ares de Araujo E., Oliveira Neto M., Craievich A. F., Polikarpov I. SAXSMoW 2.0: Online calculator of the molecular weight of proteins in dilute solution from experimental SAXS data measured on a relative scale // Protein Sci. – 2019. – T. 28, № 2. – C. 454-463.
618. Rogerson D. T., Sachdeva A., Wang K., Haq T., Kazlauskaitė A., Hancock S. M., Huguenin-Dezot N., Muqit M. M., Fry A. M., Bayliss R., Chin J. W. Efficient genetic encoding of

- phosphoserine and its nonhydrolyzable analog // *Nat Chem Biol.* – 2015. – T. 11, № 7. – C. 496-503.
619. Han D., Ye G., Liu T., Chen C., Yang X., Wan B., Pan Y., Yu L. Functional identification of a novel 14-3-3 epsilon splicing variant suggests dimerization is not necessary for 14-3-3 epsilon to inhibit UV-induced apoptosis // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2010. – T. 396, № 2. – C. 401-406.
620. Lange P. F., Huesgen P. F., Nguyen K., Overall C. M. Annotating N termini for the human proteome project: N termini and N-alpha-acetylation status differentiate stable cleaved protein species from degradation remnants in the human erythrocyte proteome // *J Proteome Res.* – 2014. – T. 13, № 4. – C. 2028-44.
621. Kim Y. S., Choi M. Y., Kim Y. H., Jeon B. T., Lee D. H., Roh G. S., Kang S. S., Kim H. J., Cho G. J., Choi W. S. Protein kinase Cdelta is associated with 14-3-3 phosphorylation in seizure-induced neuronal death // *Epilepsy Res.* – 2010. – T. 92, № 1. – C. 30-40.
622. Messaritou G., Grammenoudi S., Skoulakis E. M. Dimerization is essential for 14-3-3zeta stability and function in vivo // *J Biol Chem.* – 2010. – T. 285, № 3. – C. 1692-700.
623. Zhou Y., Reddy S., Murrey H., Fei H., Levitan I. B. Monomeric 14-3-3 protein is sufficient to modulate the activity of the *Drosophila* slowpoke calcium-dependent potassium channel // *J Biol Chem.* – 2003. – T. 278, № 12. – C. 10073-10080.
624. Burstein E. A., Vedenkina N. S., Ivkova M. N. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules // *Photochem Photobiol.* – 1973. – T. 18, № 4. – C. 263-79.
625. Bustad H. J., Underhaug J., Halskau O., Jr., Martinez A. The binding of 14-3-3gamma to membranes studied by intrinsic fluorescence spectroscopy // *FEBS Lett.* – 2011. – T. 585, № 8. – C. 1163-8.
626. Gu M., Du X. A novel ligand-binding site in the zeta-form 14-3-3 protein recognizing the platelet glycoprotein Ialpha and distinct from the c-Raf-binding site // *J. Biol. Chem.* – 1998. – T. 273, № 50. – C. 33465-33471.
627. Athwal G. S., Huber S. C. Divalent cations and polyamines bind to loop 8 of 14-3-3 proteins, modulating their interaction with phosphorylated nitrate reductase // *Plant J.* – 2002. – T. 29, № 2. – C. 119-29.
628. Aitken A. Post-translational modification of 14-3-3 isoforms and regulation of cellular function // *Semin. Cell. Dev. Biol.* – 2011. – T. 22, № 7. – C. 673-680.
629. Dubois T., Howell S., Amess B., Kerai P., Learmonth M., Madrazo J., Chaudhri M., Rittinger K., Scarabel M., Soneji Y., Aitken A. Structure and sites of phosphorylation of 14-3-3

- protein: role in coordinating signal transduction pathways // *J Protein Chem.* – 1997. – T. 16, № 5. – C. 513-22.
630. Kanno T., Nishizaki T. Sphingosine induces apoptosis in hippocampal neurons and astrocytes by activating caspase-3/-9 via a mitochondrial pathway linked to SDK/14-3-3 protein/Bax/cytochrome c // *Journal of Cellular Physiology.* – 2011. – T. 226, № 9. – C. 2329-2337.
631. Woodcock J. M., Ma Y., Coolen C., Pham D., Jones C., Lopez A. F., Pitson S. M. Sphingosine and FTY720 directly bind pro-survival 14-3-3 proteins to regulate their function // *Cell Signal.* – 2010. – T. 22, № 9. – C. 1291-9.
632. Aitken A. 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways // *Trends Cell Biol.* – 1996. – T. 6, № 9. – C. 341-7.
633. Bardwell J. C., Jakob U. Conditional disorder in chaperone action // *Trends Biochem Sci.* – 2012. – T. 37, № 12. – C. 517-25.
634. Jakob U., Kriwacki R., Uversky V. N. Conditionally and transiently disordered proteins: awakening cryptic disorder to regulate protein function // *Chem Rev.* – 2014. – T. 114, № 13. – C. 6779-805.
635. Dunker A. K., Garner E., Guilliot S., Romero P., Albrecht K., Hart J., Obradovic Z., Kissinger C., Villafranca J. E. Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations // *Pac Symp Biocomput.* – 1998. – C. 473-84.
636. Garner E., Cannon P., Romero P., Obradovic Z., Dunker A. K. Predicting Disordered Regions from Amino Acid Sequence: Common Themes Despite Differing Structural Characterization // *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform.* – 1998. – T. 9. – C. 201-213.
637. Williams R. M., Obradovi Z., Mathura V., Braun W., Garner E. C., Young J., Takayama S., Brown C. J., Dunker A. K. The protein non-folding problem: amino acid determinants of intrinsic order and disorder // *Pac Symp Biocomput.* – 2001. – C. 89-100.
638. Campen A., Williams R. M., Brown C. J., Meng J., Uversky V. N., Dunker A. K. TOP-IDP-scale: a new amino acid scale measuring propensity for intrinsic disorder // *Protein Pept Lett.* – 2008. – T. 15, № 9. – C. 956-63.
639. Radivojac P., Iakoucheva L. M., Oldfield C. J., Obradovic Z., Uversky V. N., Dunker A. K. Intrinsic disorder and functional proteomics // *Biophys J.* – 2007. – T. 92, № 5. – C. 1439-56.
640. Uversky V. N. What does it mean to be natively unfolded? // *Eur J Biochem.* – 2002. – T. 269, № 1. – C. 2-12.

641. Uversky V. N., Dunker A. K. Understanding protein non-folding // *Biochim Biophys Acta*. – 2010. – T. 1804, № 6. – C. 1231-64.
642. Vacic V., Uversky V. N., Dunker A. K., Lonardi S. Composition Profiler: a tool for discovery and visualization of amino acid composition differences // *BMC Bioinformatics*. – 2007. – T. 8. – C. 211.
643. Luo Z. J., Zhang X. F., Rapp U., Avruch J. Identification of the 14.3.3 zeta domains important for self-association and Raf binding // *J. Biol. Chem.* – 1995. – T. 270, № 40. – C. 23681-23687.
644. Receveur-Brechot V., Durand D. How random are intrinsically disordered proteins? A small angle scattering perspective // *Curr Protein Pept Sci*. – 2012. – T. 13, № 1. – C. 55-75.
645. Franke D., Svergun D. I. DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering // *J Appl Crystallogr*. – 2009. – T. 42, № Pt 2. – C. 342-346.
646. Goodwin K. L. Localisation of the molecular chaperone site of 14-3-3 ζ : an intracellular protein associated with toxic neurological protein aggregates; University of Adelaide. – University of Adelaide, School of Physical Sciences, Australia, 2015.
647. Holt C., Raynes J. K., Carver J. A. Sequence characteristics responsible for protein-protein interactions in the intrinsically disordered regions of caseins, amelogenins, and small heat-shock proteins // *Biopolymers*. – 2019. – T. 110, № 9. – C. e23319.
648. Rekas A., Ahn K. J., Kim J., Carver J. A. The chaperone activity of alpha-synuclein: Utilizing deletion mutants to map its interaction with target proteins // *Proteins*. – 2012. – T. 80, № 5. – C. 1316-25.
649. Alderson T. R., Roche J., Gastall H. Y., Dias D. M., Pritisanac I., Ying J., Bax A., Benesch J. L. P., Baldwin A. J. Local unfolding of the HSP27 monomer regulates chaperone activity // *Nat Commun*. – 2019. – T. 10, № 1. – C. 1068.
650. Hochgrebe T., Pankhurst G. J., Wilce J., Easterbrook-Smith S. B. pH-dependent changes in the in vitro ligand-binding properties and structure of human clusterin // *Biochemistry*. – 2000. – T. 39, № 6. – C. 1411-9.
651. Suragani M., Aadinarayana V. D., Pinjari A. B., Tanneeru K., Guruprasad L., Banerjee S., Pandey S., Chaudhuri T. K., Ehtesham N. Z. Human resistin, a proinflammatory cytokine, shows chaperone-like activity // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – T. 110, № 51. – C. 20467-20472.
652. Reddy G. B., Kumar P. A., Kumar M. S. Chaperone-like activity and hydrophobicity of alpha-crystallin // *IUBMB Life*. – 2006. – T. 58, № 11. – C. 632-41.

653. Derham B. K., Harding J. J. Alpha-crystallin as a molecular chaperone // *Prog Retin Eye Res.* – 1999. – T. 18, № 4. – C. 463-509.
654. Eisenberg D., Schwarz E., Komaromy M., Wall R. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot // *J Mol Biol.* – 1984. – T. 179, № 1. – C. 125-42.
655. Das B. K., Liang J. J., Chakrabarti B. Heat-induced conformational change and increased chaperone activity of lens alpha-crystallin // *Curr Eye Res.* – 1997. – T. 16, № 4. – C. 303-9.
656. Bumagina Z., Gurvits B., Artemova N., Muranov K., Kurganov B. Paradoxical acceleration of dithiothreitol-induced aggregation of insulin in the presence of a chaperone // *Int J Mol Sci.* – 2010. – T. 11, № 11. – C. 4556-79.
657. Dabbaghizadeh A., Finet S., Morrow G., Moutaoufik M. T., Tanguay R. M. Oligomeric structure and chaperone-like activity of *Drosophila melanogaster* mitochondrial small heat shock protein Hsp22 and arginine mutants in the alpha-crystallin domain // *Cell Stress Chaperones.* – 2017. – T. 22, № 4. – C. 577-588.
658. Yang M., Dutta C., Tiwari A. Disulfide-bond scrambling promotes amorphous aggregates in lysozyme and bovine serum albumin // *J Phys Chem B.* – 2015. – T. 119, № 10. – C. 3969-81.
659. Markov D. I., Zubov E. O., Nikolaeva O. P., Kurganov B. I., Levitsky D. I. Thermal denaturation and aggregation of Myosin subfragment 1 isoforms with different essential light chains // *Int J Mol Sci.* – 2010. – T. 11, № 11. – C. 4194-226.
660. Markov D. I., Pivovarova A. V., Chernik I. S., Gusev N. B., Levitsky D. I. Small heat shock protein Hsp27 protects myosin S1 from heat-induced aggregation, but not from thermal denaturation and ATPase inactivation // *FEBS Lett.* – 2008. – T. 582, № 10. – C. 1407-12.
661. Mikhaylova V. V., Eronina T. B., Chebotareva N. A., Shubin V. V., Kalacheva D. I., Kurganov B. I. Effect of Arginine on Chaperone-Like Activity of HspB6 and Monomeric 14-3-3zeta // *Int J Mol Sci.* – 2020. – T. 21, № 6.
662. Invernizzi G., Papaleo E., Sabate R., Ventura S. Protein aggregation: mechanisms and functional consequences // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2012. – T. 44, № 9. – C. 1541-54.
663. Meredith S. C. Protein denaturation and aggregation: Cellular responses to denatured and aggregated proteins // *Ann N Y Acad Sci.* – 2005. – T. 1066. – C. 181-221.
664. Wolozin B. Regulated protein aggregation: stress granules and neurodegeneration // *Mol Neurodegener.* – 2012. – T. 7. – C. 56.
665. Hartl F. U., Bracher A., Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis // *Nature.* – 2011. – T. 475, № 7356. – C. 324-32.

666. Voisine C., Pedersen J. S., Morimoto R. I. Chaperone networks: tipping the balance in protein folding diseases // *Neurobiol Dis.* – 2010. – T. 40, № 1. – C. 12-20.
667. Parsell D. A., Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins // *Annu Rev Genet.* – 1993. – T. 27. – C. 437-96.
668. Velichko A. K., Markova E. N., Petrova N. V., Razin S. V., Kantidze O. L. Mechanisms of heat shock response in mammals // *Cellular and Molecular Life Sciences.* – 2013. – T. 70, № 22. – C. 4229-4241.
669. Lee J. R., Lee S. S., Jang H. H., Lee Y. M., Park J. H., Park S. C., Moon J. C., Park S. K., Kim S. Y., Lee S. Y., Chae H. B., Jung Y. J., Kim W. Y., Shin M. R., Cheong G. W., Kim M. G., Kang K. R., Lee K. O., Yun D. J. Heat-shock dependent oligomeric status alters the function of a plant-specific thioredoxin-like protein, AtTDX // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009. – T. 106, № 14. – C. 5978-83.
670. Scranton M. A., Yee A., Park S. Y., Walling L. L. Plant leucine aminopeptidases moonlight as molecular chaperones to alleviate stress-induced damage // *J Biol Chem.* – 2012. – T. 287, № 22. – C. 18408-17.
671. Jang H. H., Lee K. O., Chi Y. H., Jung B. G., Park S. K., Park J. H., Lee J. R., Lee S. S., Moon J. C., Yun J. W., Choi Y. O., Kim W. Y., Kang J. S., Cheong G. W., Yun D. J., Rhee S. G., Cho M. J., Lee S. Y. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function // *Cell.* – 2004. – T. 117, № 5. – C. 625-35.
672. Kovacs D., Rakacs M., Agoston B., Lenkey K., Semrad K., Schroeder R., Tompa P. Janus chaperones: assistance of both RNA- and protein-folding by ribosomal proteins // *FEBS Lett.* – 2009. – T. 583, № 1. – C. 88-92.
673. Ferdosh S., Banerjee S., Pathak B. K., Sengupta J., Barat C. Hibernating ribosomes exhibit chaperoning activity but can resist unfolded protein-mediated subunit dissociation // *The FEBS Journal* – T. n/a, № n/a.
674. Kern R., Malki A., Abdallah J., Tagourti J., Richarme G. *Escherichia coli* HdeB is an acid stress chaperone // *J Bacteriol.* – 2007. – T. 189, № 2. – C. 603-10.
675. Zhang B. W., Brunetti L., Brooks C. L., 3rd. Probing pH-dependent dissociation of HdeA dimers // *J Am Chem Soc.* – 2011. – T. 133, № 48. – C. 19393-8.
676. Poon S., Treweek T. M., Wilson M. R., Easterbrook-Smith S. B., Carver J. A. Clusterin is an extracellular chaperone that specifically interacts with slowly aggregating proteins on their off-folding pathway // *FEBS Lett.* – 2002. – T. 513, № 2-3. – C. 259-66.

677. Shashidharamurthy R., Koteiche H. A., Dong J., McHaourab H. S. Mechanism of chaperone function in small heat shock proteins: dissociation of the HSP27 oligomer is required for recognition and binding of destabilized T4 lysozyme // *J Biol Chem.* – 2005. – T. 280, № 7. – C. 5281-9.
678. Kaneko K., Hachiya N. The alternative role of 14-3-3 zeta as a sweeper of misfolded proteins in disease conditions // *Medical hypotheses.* – 2006. – T. 67, № 1. – C. 169-171.

Благодарности

Автор глубоко благодарен своему научному консультанту, чл.-корр. РАН, профессору, доктору биологических наук Н.Б. Гусеву за неоценимый вклад в становление автора как ученого-исследователя, за продуктивные и интересные научные дискуссии, неиссякаемую поддержку и помощь в организационных вопросах. Автор искренне признателен профессору, доктору биологических наук Д.И. Левицкому за приятные научные обсуждения и ценные советы на протяжении долгих лет совместной работы. Автор выражает огромную благодарность к.б.н. А.С. Сеит-Неби за ценные советы в области молекулярной биологии, а также профессору С.В. Стрелкову (Католический университет г. Лёвен, Бельгия) и профессору А.А. Антсону (Лаборатория структурной биологии, Университет Йорка, Великобритания) за терпение и многолетнюю помощь в освоении и совершенствовании навыков в области кристаллографии. Автор признателен преподавателям практических и лекционных курсов FEBS и EMBO по теоретическим основам и применению методов структурной биологии, а также преподавателям кафедры биохимии биологического факультета МГУ, которые во многом сформировали автора как самостоятельного ученого.

Автор глубоко признателен д.б.н. Н.А. Чеботаревой за помощь в проведении экспериментов и консультации по аналитическому ультрацентрифугированию, к.б.н. А.А. Куликовой за помощь в проведении опытов по изотермической титрационной калориметрии, проф. Ж. Траве за мудрые советы и помощь в интерактомных и структурных исследованиях в области 14-3-3 и папилломавирусных белков, к.б.н. А.В. Шкуматову за помощь в освоении метода малоуглового рассеяния рентгеновских лучей, профессору В.Н. Уверскому за интересные дискуссии и советы по анализу структуры и свойств белков IDP. Автор признателен к.б.н. Судницыной М.В. за помощь в исследовании мономерных форм белка 14-3-3 и всестороннюю поддержку.

Я признателен членам своей научной группы за исключительную исполнительность, ответственность, вдумчивое отношение и интерес к работе, а также поддержку и помощь в различных вопросах.

Я глубоко признателен своим родителям и членам семьи за тепло и поддержку, без которых выполнение этой работы было бы совершенно невозможно.