

На правах рукописи



СЛУЧАНКО Николай Николаевич

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

03.01.04 Биохимия

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени доктора биологических наук

Москва 2020

Работа выполнена в группе белок-белковые взаимодействия Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

НАУЧНЫЙ КОНСУЛЬТАНТ:

Гусев Николай Борисович, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, Биологический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», кафедра биохимии, заведующий кафедрой.

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Кочетков Сергей Николаевич, доктор химических наук, профессор, академик РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук, лаборатория молекулярных основ действия физиологически активных соединений, заведующий лабораторией.

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

Гривенников Игорь Анатольевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», лаборатория молекулярной генетики соматических клеток, заведующий лабораторией.

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

Защита состоится «18» февраля 2021 г. в 14 час на заседании Совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на сайте <http://fbras.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Проблемы узнавания крайне важны в биологии. Актуальны они и для таких систем как белок-белковые взаимодействия (ББВ)¹, 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-

¹ **Список сокращений:** АБ – амфипатическая бороздка; АДГ – алкогольдегидрогеназа; АУЦ – аналитическое ультрацентрифугирование; ББВ – белок-белковые взаимодействия; бис-АНС – бис-анилинонафталенсульфонат; ГФ – гель-фильтрация; ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия; ДСН – додецилсульфат натрия; ИТК – изотермическая калориметрия титрования; КД – круговой дихроизм; МУРР – малоугловое рассеяние рентгена; РСА – рентгеноструктурный анализ; ТМАО – триметиламиноксид; УФ – ультрафиолет; AEDANS – 5-[2-(йодоацетоамидо)этиламино]нафталин-1-сульфо кислота; СТД – С-концевой домен; NTD – N-концевой домен; РКА – цАМФ-зависимая протеинкиназа; WT – белок дикого типа.

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 кажущаяся 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 С-концевым мотивом вида pS/pTXX-COON, но и показана селективность действия фузикокина – широко известного стабилизатора взаимодействий с участием 14-3-3, который в случае 14-3-3/E6 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_а, 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 Дагомысе 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 работы

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

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

Наиболее стабильной формой белков 14-3-3 в растворе являются α -спиральные димеры с гибким С-концевым пептидом, удаление которого практически не влияет на конформацию «ядра» димеров (Рис. 1). Конформация ядра димера в растворе может быть хорошо описана кристаллографической структурой, согласно которой оба мономера 14-3-3 несут по одной амфипатической бороздке (АБ) для связывания фосфопептидов и образуют обширный интерфейс (Рис. 1).

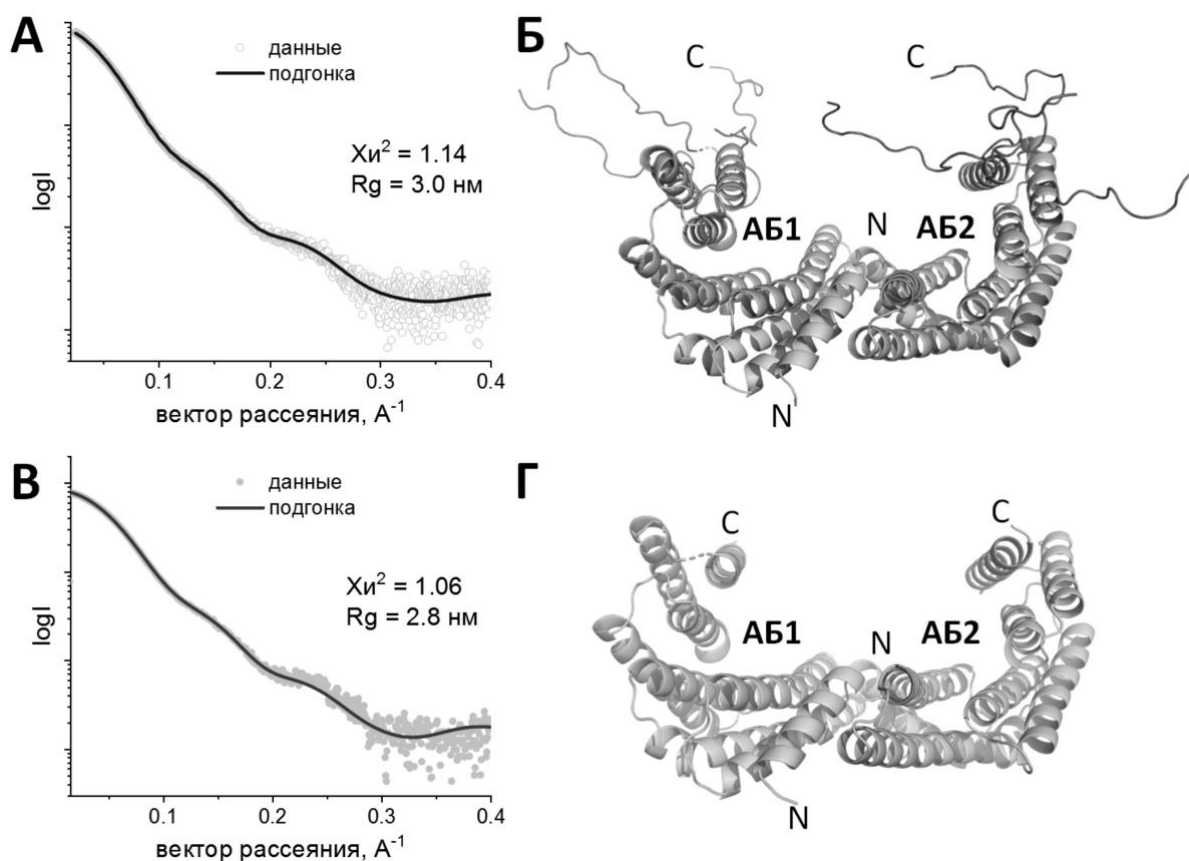


Рис. 1. Конформация димеров 14-3-3 ζ в растворе. Результат фитирования экспериментальных данных МУРР для полноразмерного белка 14-3-3 ζ (остатки 1-245) (А) с помощью моделей с различным положением С-концевого пептида, рассчитанных с помощью метода *EOM* (Б). Результат фитирования данных МУРР для 14-3-3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

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 под действием циклонуклеотид-зависимых протеинкиназ при расслаблении гладкой мускулатуры [5, 6]. Несмотря на то, что в разбавленном растворе белок HSPB6 («B6») представлен преимущественно димерами [5], малым белкам теплового шока свойственна выраженная склонность к образованию олигомеров высокого порядка [7]. Например, по данным АУЦ, α V-кристаллин (HSPB5) в концентрации 0,3 мг/мл при 20°C образует частицы с коэффициентом седиментации 18 S, радиусом Стокса 10,8 нм и массой 735 ± 82 кДа, что, с учетом массы субъединицы 20 кДа, соответствует его 36-мерам (здесь не показано).

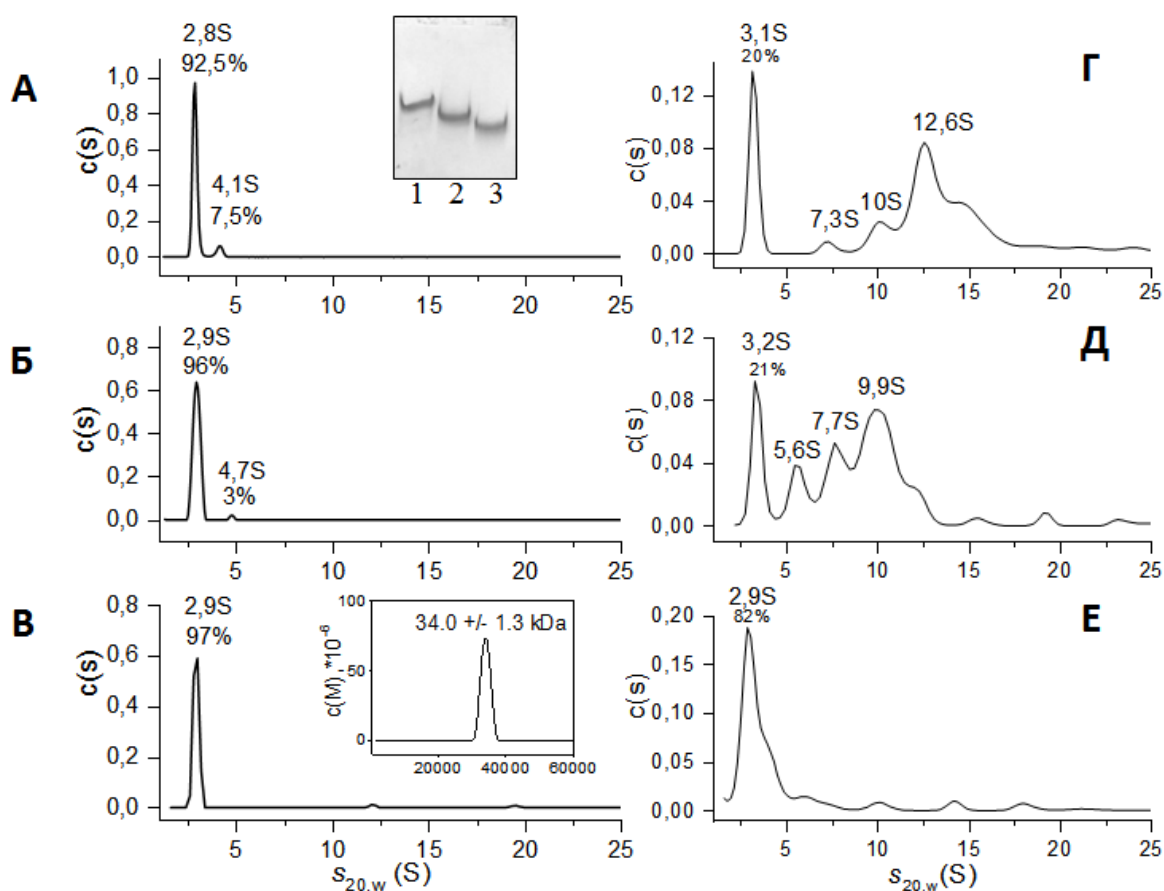


Рис. 2. Седиментация нефосфорилированного HSPB6 (для краткости здесь и дальше – «B6») (А,Г), фосфоимитирующего мутанта S16D (Б,Д) и фосфорилированного B6 (В,Е) в отсутствие (А,Б,В), либо в присутствии 1 М ТМАО (Г,Д,Е) при 20°C и скорости вращения ротора 52000 об/мин. Концентрация белка 0,3 мг/мл. Вставка на панели А показывает электрофоретическую подвижность B6 (1), S16D (2) и pB6 (3) при гель-электрофорезе 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 условиях краудинга, имитируемого добавлением ТМАО, проявляется выраженная самоассоциация белка В6, сопровождающаяся появлением наряду с низкомолекулярными (2,8 S) его высокомолекулярных олигомерных форм (7,3 S, 10,0 S, 12,6 S) (Рис. 2). В этих условиях, фосфорилированная по Ser16 форма В6 («pВ6») оставалась в виде небольших олигомеров (2,9 S), а мутантная форма S16D, имитирующая фосфорилирование, демонстрировала промежуточное распределение с(s). По всей видимости, это обусловлено лишь частичной имитацией фосфорилирования при введении отрицательного заряда в случае S16D, в результате чего подвижность при нативном электрофорезе у мутантной формы также была промежуточной (Рис. 2). Низкомолекулярные 2,9-3,2 S олигомеры В6, доминирующие в отсутствие ТМАО и в случае фосфорилированного белка, соответствовали массе $34,0 \pm 1,3$ кДа. С учетом расчетной массы мономера, равной 17,1 кДа, эти результаты означают, что димеры В6, доминирующие в разбавленных растворах, проявляют значительную склонность к самоассоциации в условиях краудинга, однако фосфорилирование остатка Ser16 эффективно препятствует этому, предрасполагая димеры белка pВ6 к взаимодействию с димерами 14-3-3.

1.2. Эффект фосфата на взаимодействие белков 14-3-3 и HSPВ6

Ранее было показано, что только фосфорилированная форма белка В6 («pВ6») способна взаимодействовать с 14-3-3 γ [5], и что 14-3-3 способны связывать фосфопептиды В6 [6]. Это означает, что остаток фосфата играет ключевую роль в узнавании pВ6 белками 14-3-3, и позволяет предположить, что наличие низкомолекулярных фосфатов и других анионов, присутствующих в клетке в миллимолярных концентрациях, может влиять на это взаимодействие. При сравнении способности 14-3-3 и В6 взаимодействовать в отсутствие или в присутствии неорганического фосфата нам удалось подтвердить эту гипотезу (Рис. 3). При ГФ в отсутствие фосфата только фосфорилированная форма В6 образовывала комплекс с 14-3-3 ζ , детектируемый как сдвиг на профиле элюции, при этом фосфат в концентрации

75 мМ полностью предотвращал это взаимодействие (Рис. 3А,Б). Сходная картина наблюдалась при взаимодействии рВ6 с 14-3-3 γ (Рис. 3В-Е). Мы обнаружили, что ингибирующий эффект фосфата зависит от его концентрации, причем заметное ингибирование наблюдалось уже при концентрации 10 мМ (Рис. 4А). Несмотря на то, что самая высокая физиологическая концентрация фосфата, достигаемая в мышцах при продолжительном сокращении, не превышает 3-5 мМ, можно предполагать, что фосфат оказывает модулирующее действие на некоторые белковые комплексы с участием 14-3-3.

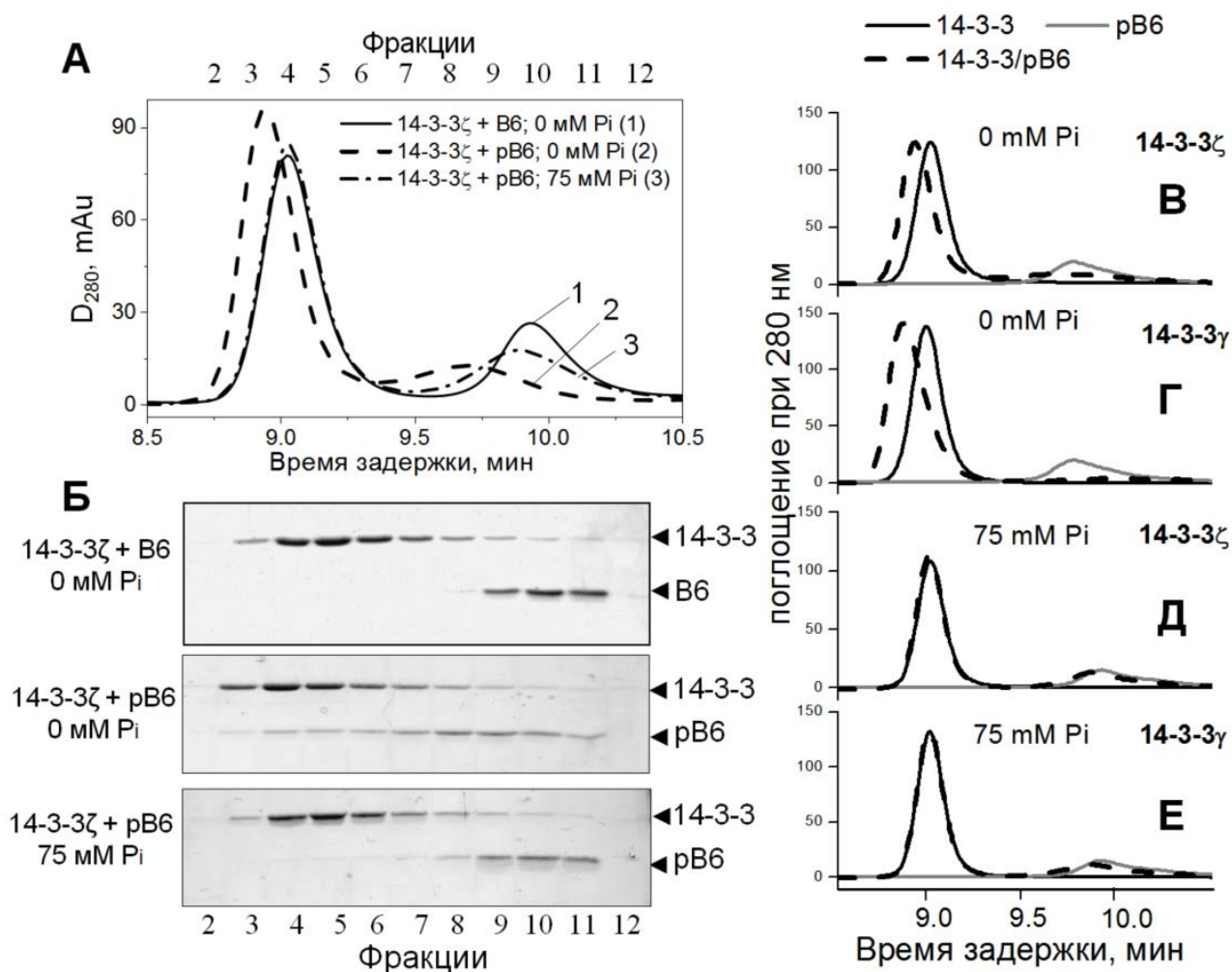


Рис. 3. Эффект фосфорилирования белка В6 и добавления 75 мМ неорганического фосфата (Pi) на взаимодействие В6 и 14-3-3, по данным ГФ (А) с последующим анализом фракций методом ДСН-электрофореза (Б). На колонку наносили смесь 14-3-3 ζ с нефосфорилированным В6 (1), фосфорилированным В6 в отсутствие (2) 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).

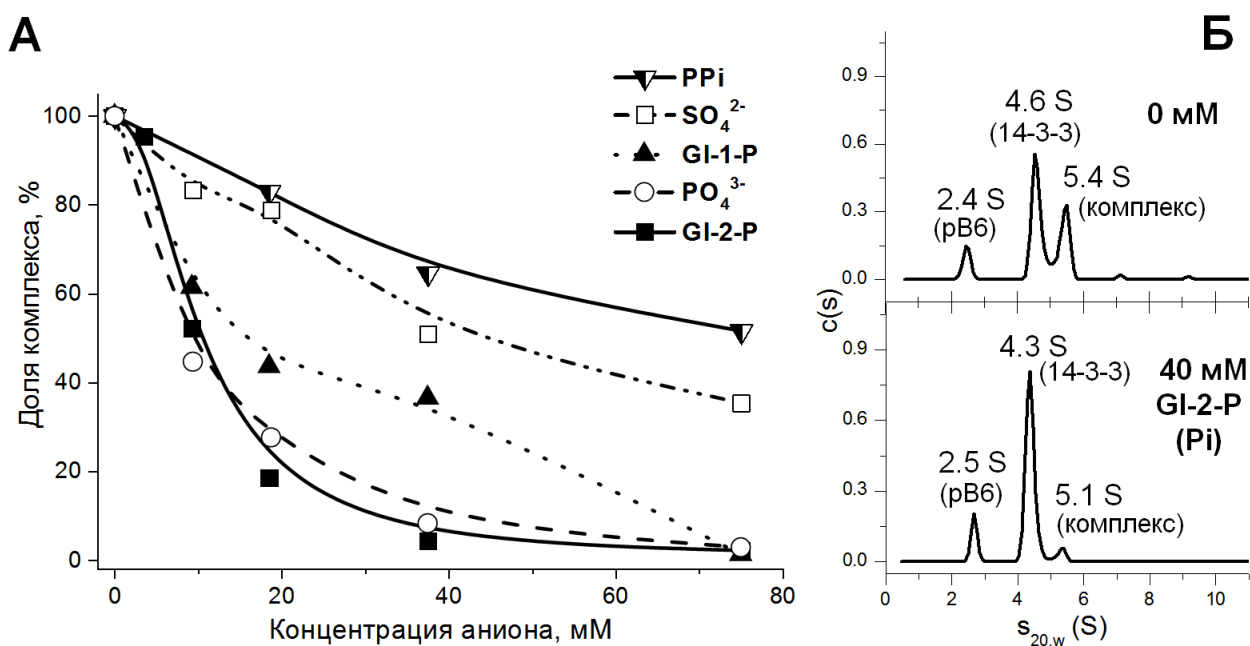


Рис. 4. Эффект анионов на взаимодействие 14-3-3ζ с pB6, по данным ГФ (А) и АУЦ (Б). А. На колонку наносили комплекс 14-3-3ζ с pB6 в отсутствие или в присутствии различных концентраций сульфата, пирофосфата, фосфата, а также 1- и 2-глицерофосфата. Увеличение концентрации анионов приводило к уменьшению сдвига на профиле элюции, соответствующего комплексу 14-3-3ζ/pB6 (в отсутствие анионов долю комплекса считали за 100%). Б. Эффект 2-глицерофосфата на образование комплекса 14-3-3ζ/pB6 при АУЦ. Аналогичный эффект, соответствующий почти полному исчезновению пика комплекса, наблюдали для аналогичной концентрации (40 mM) фосфата.

Оказалось, что фосфат, 1-глицерофосфат и 2-глицерофосфат оказывают сопоставимое ингибирующее действие на взаимодействие 14-3-3 и pB6, в то время как сульфат и пирофосфат значительно менее эффективны (Рис. 4А). Во всех случаях ингибирующий эффект зависел от концентрации анионов (Рис. 4А). Результаты ГФ подтверждались данными АУЦ (Рис. 4Б). Нам удалось определить кристаллическую структуру димера 14-3-3σ в присутствии 2М фосфата, который связывался в АБ 14-3-3 (здесь не показано). Таким образом, ингибирование взаимодействия 14-3-3 с фосфорилированным белком-партнером под действием фосфата и других анионов, по всей видимости, происходит из-за конкуренции за фосфопептид-связывающий участок 14-3-3, что указывает на особую роль фосфорилирования пептидов в узнавании.

1.3. Взаимодействие фрагментов HSPB6 с белками 14-3-3

Белок B6 содержит типичный для малых белков теплового шока свернутый α-кристаллиновый домен (АКД) ближе к С концу

последовательности, а также протяженный неструктурированный N-концевой домен (NTD). В NTD располагается остаток Ser16 (Рис. 5А), который хорошо фосфорилируется под действием PKA *in vitro*.

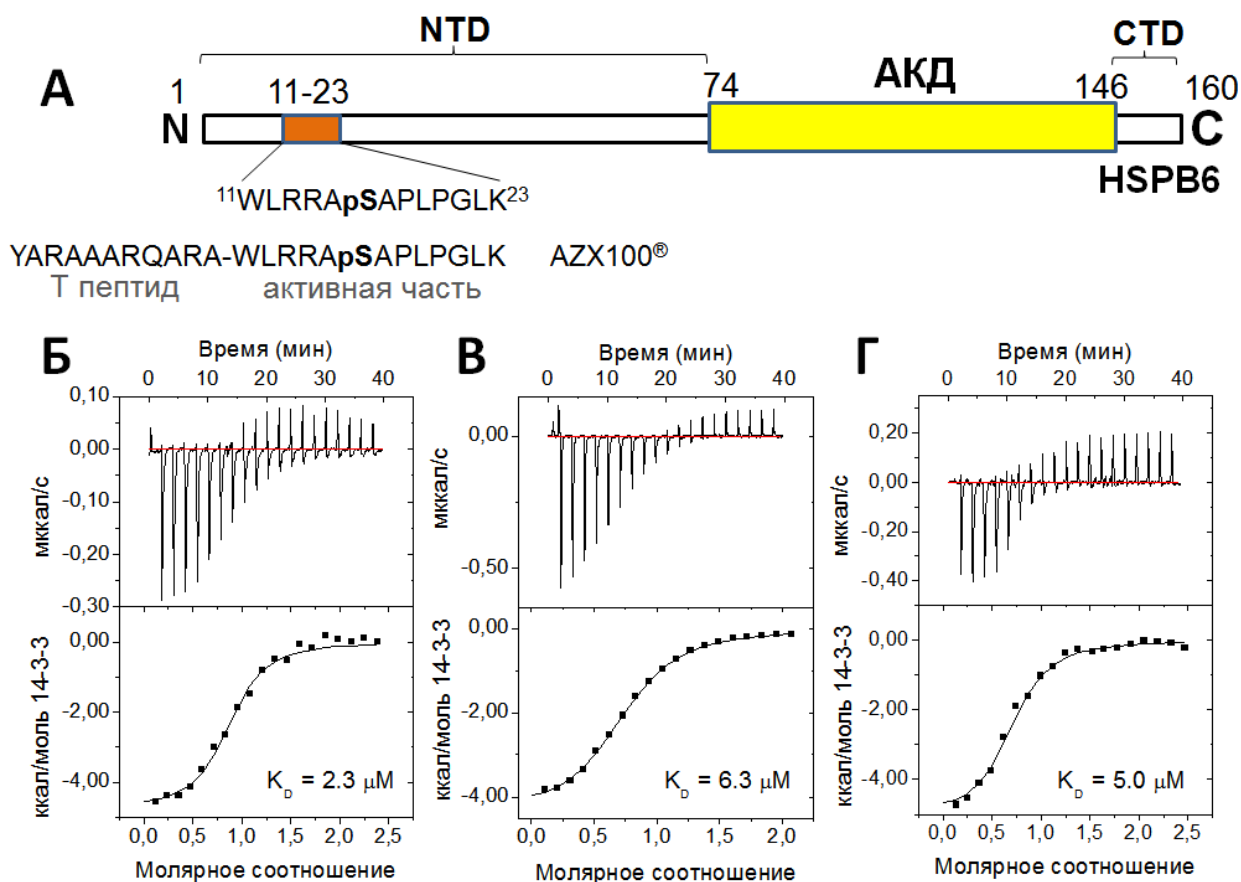


Рис. 5. А. Принципиальная схема В6, на которой показано расположение фосфопептида (остатки 11-23), содержащего Ser16, α -кристаллинового домена (АКД) и разупорядоченных участков NTD и CTD. Ниже приведены последовательности фосфопептида В6 и терапевтического фосфопептида AZX100® (состоит из проникающего Т пептида и активной части). Анализ взаимодействия фосфопептида В6 с 14-3-3 γ (Б), 14-3-3 σ (В) и 14-3-3 ζ (Г) методом ИТК. 1 мМ раствор 14-3-3 добавляли аликвотами к 85 μ М раствору фосфопептида при температуре 30°C. Указаны кажущиеся константы диссоциации, полученные при фитировании экспериментальных кривых моделью одного сайта связывания (1 пептид на 1 мономер 14-3-3).

Для понимания молекулярного механизма взаимодействия 14-3-3 и рВ6 на первом этапе мы исследовали взаимодействие 14-3-3 с фосфопептидами В6. Был синтезирован фосфопептид рВ6.11-23, который является активной частью терапевтического пептида AZX100® с рядом физиологических эффектов, повторяющих свойства полноразмерного белка В6 [8]. По данным ИТК, различные изоформы 14-3-3 показали микромолярную аффинность к рВ6.11-23 (K_D 2,3-6,3 μ М), при этом стехиометрия соответствовала связыванию одного фосфопептида с каждой АБ димера 14-3-3 (Рис. 5Б-Г).

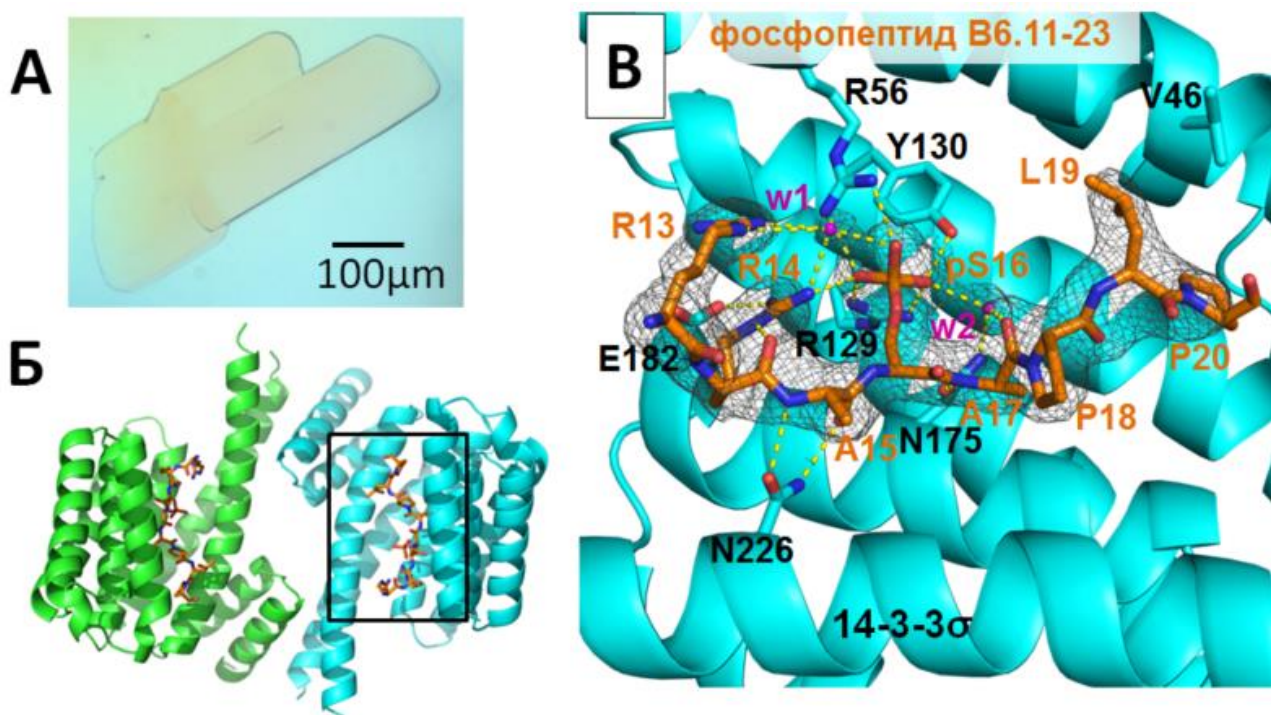


Рис. 6. Кристаллическая структура комплекса 14-3-3 σ с фосфопептидом B6.11-23 (код PDB 5LU2, разрешение 2,5 Å). А. Кристалл комплекса 14-3-3 σ с фосфопептидом, использованный для решения структуры. Б. Связывание фосфопептидов в обеих АБ димера 14-3-3 σ . В. Крупный план показывает карту электронной плотности 2Fo-Fc (серая сетка, контур на 1 σ) для фосфопептида (оранжевый) и упорядоченных молекул воды (w1, w2, пурпурные), полярные контакты отмечены желтыми пунктирными линиями.

Нам удалось закристаллизовать комплекс 14-3-3 σ с рВ6.11-23 (Рис. 6А) и определить его структуру с разрешением 2,4Å (Рис. 6Б,В), которая подтвердила связывание фосфопептидов в АБ каждой из субъединиц 14-3-3 σ . Конформация фосфопептида стабилизирована сетью полярных контактов, включая каноническое для пептидных комплексов 14-3-3 взаимодействие фосфатной группы с остатками R56, R129, Y130, а также гидрофобные взаимодействия остатка L19 пептида и V46 14-3-3 σ (Рис. 6В).

По данным гель-фильтрации, изолированный В6 АКД, образующий стабильный димер, не способен формировать прочные комплексы с димером 14-3-3 $\sigma\Delta C$ (Рис. 7), что подчеркивает первичную роль фосфопептидов В6 в связывании 14-3-3. Для изучения взаимодействия полноразмерного рВ6 с 14-3-3 мы использовали единственный остаток Cys46 в последовательности рВ6 и поместили его флуоресцентной меткой AEDANS, способной реагировать на взаимодействие с 14-3-3 изменением спектра флуоресценции (Рис. 8А). Это

позволило нам получить кривую связывания и по ней определить кажущуюся константу диссоциации полного белок-белкового комплекса (K_D 0,6 μM , Рис. 8А).

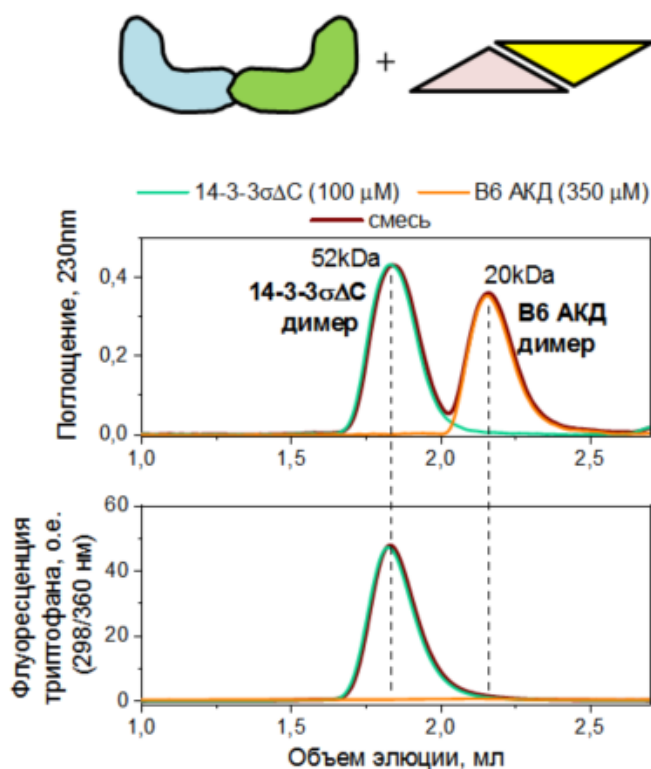


Рис. 7. Изолированный α -кристаллиновый домен В6 (В6 АКД) не способен образовывать прочный комплекс с 14-3-3 σ . Сверху представлена схема эксперимента, результаты которого показаны снизу. Два белка отдельно или в смеси в указанных концентрациях были нанесены на колонку Superdex 200 Increase 5/150. Профили 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.

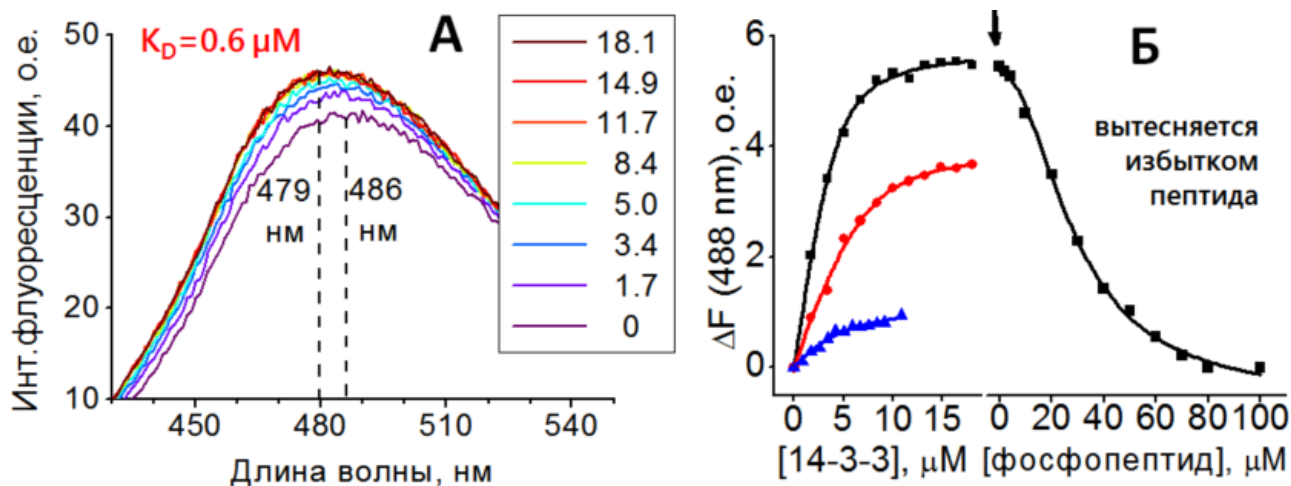


Рис. 8. Взаимодействие pV6, меченного AEDANS, с 14-3-3 σ , по данным флуоресцентной спектроскопии. А. Изменения в спектре флуоресценции AEDANS (возбуждение при 336 нм) для раствора 4,2 μM pV6^{AEDANS} при титровании увеличивающимися концентрациями 14-3-3 σ (указаны в μM , кодированы цветом). Б. Изменения интенсивности флуоресценции (ΔF) при 488 нм при титровании 4,2 μM раствора pV6^{AEDANS} белком 14-3-3 σ в отсутствие фосфопептида В6 с последующим (в момент времени, обозначенный стрелкой) титрованием фосфопептидом В6.11-23. Альтернативно, ΔF измеряли для раствора pV6^{AEDANS} с концентрацией 4,2 μM (красная линия, кружки) или 2,8 μM (синяя линия, треугольники) с добавлением 4,2 μM или 20 μM фосфопептида, соответственно, титруя с помощью 14-3-3 σ .

Полученная константа диссоциации комплекса с полноразмерным рВ6 указывает на его более высокое сродство к 14-3-3 по сравнению с фосфопептидами. Это может быть связано с кооперативным связыванием дважды фосфорилированного димера В6 в обеих АБ 14-3-3 по сравнению со связыванием монофосфорилированных пептидов (Рис. 5). Также можно предположить многоточечный характер взаимодействия в полноразмерном комплексе. Важно, что связывание полноразмерного рВ6^{AEDANS} с 14-3-3σ ингибировалось в присутствии фосфопептида рВ6.11-23, а уже связанный рВ6^{AEDANS} вытеснялся из комплекса при добавлении фосфопептидов (Рис. 8Б). Таким образом, взаимодействие фосфопептидов с АБ в димере 14-3-3 является *первичным*, в то же время наши данные указывали на участие *вторичных* взаимодействий в стабилизации архитектуры комплекса.

1.4. Кристаллическая структура комплекса белков 14-3-3 и HSPB6

Для получения структуры была использована система ко-экспрессии В6 с каталитической субъединицей РКА в *E.coli*. Полученный фосфорилированный белок был очищен и использован для образования комплексов с 14-3-3. Были получены комплексы рВ6 с каждой из семи изоформ 14-3-3 человека, однако только в случае 14-3-3σ мы смогли обнаружить формирование кристаллов. Использование серии укороченных мутантных форм как рВ6, так и 14-3-3σ, а также введение в 14-3-3σ замен, снижающих поверхностную энтропию (и поэтому увеличивающих кристаллизуемость [9]), и использование более сотни оптимизированных кристаллов позволило улучшить дифракцию и решить кристаллическую структуру с разрешением 4,5Å (код PDB 5LTW, Рис. 9А,Б). Для уточнения этой структуры была использована 2,4Å-структура 14-3-3σ с рВ6.11-23 (код PDB 5LU2, Рис. 6В), а также отдельно полученная 2,6Å-структура В6 АКД в комплексе с синтетическим N-концевым пептидом В6 2-10 (код PDB 5LUM, Рис. 9В).

Кристаллографический тетрамерный комплекс 2 14-3-3σ : 2 рВ6 стабилизирован связыванием фосфопептидов В6 в амфипатических бороздках

обеих субъединиц 14-3-3 σ , а также асимметричным примыканием АКД к С-концевым α -спиралям одной из субъединиц 14-3-3 (Рис. 9А).

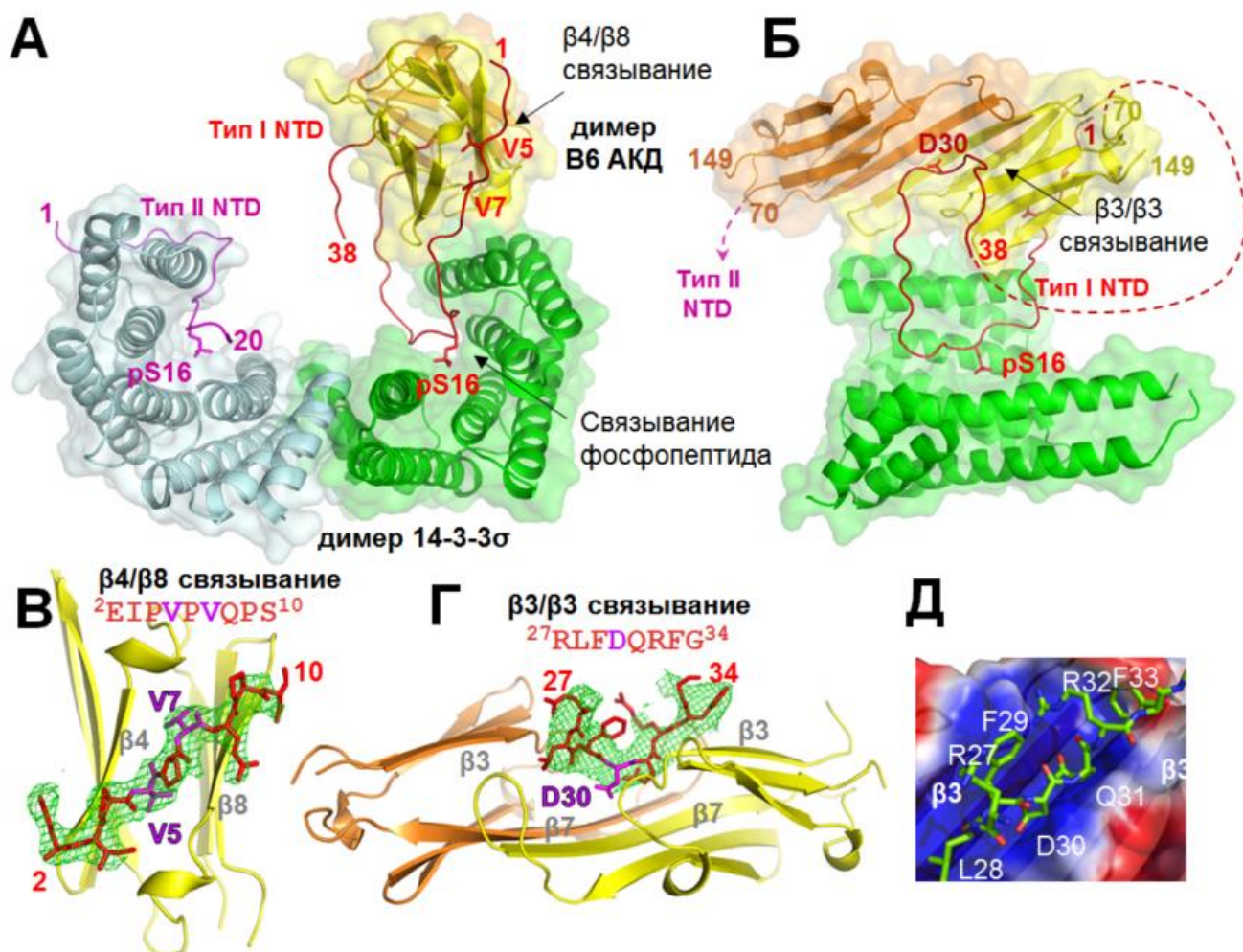


Рис. 9. Кристаллическая структура полного комплекса 14-3-3 σ /pV6 (код PDB 5LTW, разрешение 4,5Å). А,Б. Ленточная диаграмма гетеротетрамера в двух перпендикулярных проекциях (на панели Б вторая молекула 14-3-3 опущена для наглядности). Упорядоченные части NTD В6 типа I и II окрашены в красный и пурпурный 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 β 4/ β 8 бороздке АКД, наблюдаемое в его ко-кристаллах с N-концевым пептидом ${}^2\text{EIPVPVQPS}^{10}$ (код PDB 5LUM, разрешение 2,6Å). Для наглядности показана только одна цепь АКД. Разностная “omit” Fo-Fc карта электронной плотности для пептида показана с контуром 2,5 σ (зеленая сетка). Г. Связывание в β 3/ β 3 канавке димера В6 АКД консервативного фрагмента NTD в составе комплекса 14-3-3 σ /pV6. Соответствующая разностная “omit” карта с разрешением 4,5Å с контуром 2,5 σ (зеленая сетка). Д. Крупный план взаимодействия консервативного фрагмента NTD (остатки 27-34) с β 3/ β 3 канавкой АКД. Полупрозрачная поверхность димера АКД окрашена согласно значениям электростатического потенциала от -1 (красный) до +1 кТ/е (синий).

При образовании комплекса значительная часть В6 NTD упорядочивается, и отдельные его сегменты связываются в β 4/ β 8 и β 3/ β 3 канавках АКД, дополнительно стабилизируя сборку (Рис. 9В,Г). Из-за

асимметрии структуры наблюдаются два типа конформаций В6 NTD (остатки 1-70), только в одной из которых NTD попадает в $\beta 3/\beta 3$ канавку АКД. Ввиду сильной разупорядоченности, сегменты 39-69 одной цепи и 21-69 второй цепи димера В6 отсутствуют в картах электронной плотности. Сегмент В6 NTD (остатки 27-34), который связывается в $\beta 3/\beta 3$ канавке АКД с участием электростатических взаимодействий (Рис. 9Д), является самым консервативным сегментом NTD малых белков теплового шока и, предположительно, играет роль в образовании их гетеродимеров [10].

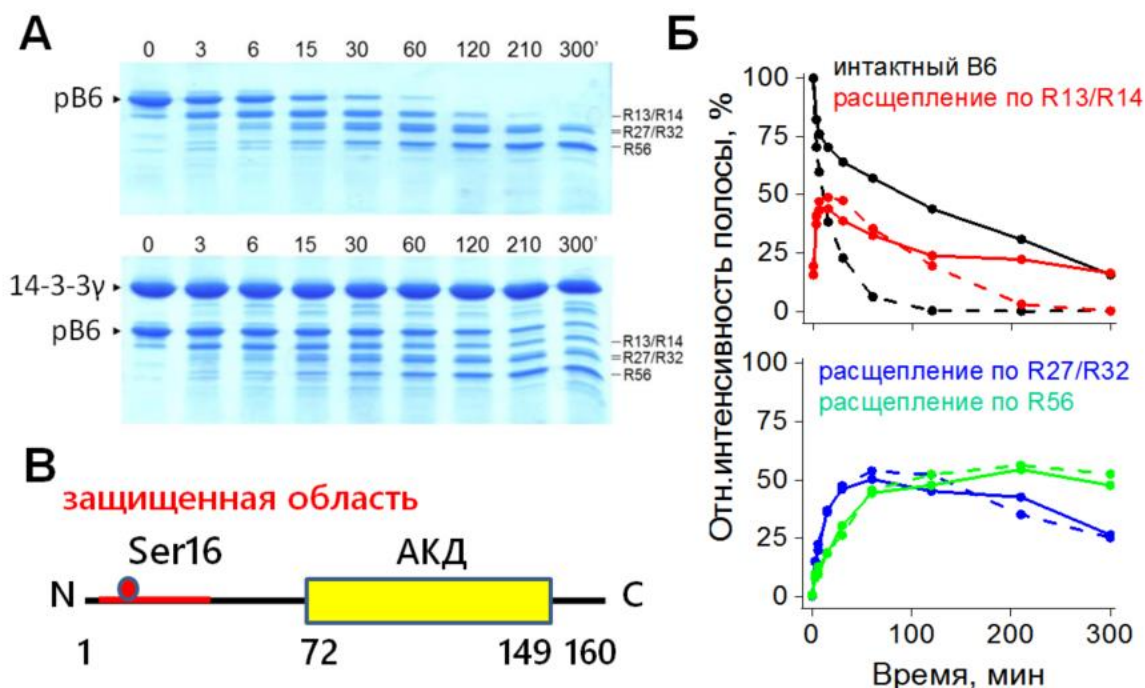


Рис. 10. Влияние 14-3-3γ на ограниченный трипсинолиз pV6. А. Показана кинетика (мин) переваривания pV6 в отсутствие (сверху) или в присутствии 14-3-3γ (снизу) при весовом соотношении pV6/трипсин 1:1500. Пептиды, образующиеся при расщеплении по остаткам R13, R14, R27, R32 и R56 и идентифицированные методом масс-спектрометрии, отмечены справа. Расщепление 14-3-3γ в параллельном контрольном эксперименте было незначительным. Б. Кинетика трипсинолиза pV6 (пунктирные линии) или pV6 в комплексе с 14-3-3γ (сплошные линии), показывающая эволюцию интенсивностей полос для интактного pV6 и продуктов его расщепления в указанных местах. Все интенсивности полос выражены в процентах от интенсивности интактной полосы pV6 в нулевое время. В. Схема, показывающая область вокруг Ser16, защищенную от протеолиза в комплексе с 14-3-3γ.

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

Получив кристаллическую структуру, мы провели анализ структуры полного комплекса в растворе с помощью ограниченного трипсинолиза (Рис. 10), МУРР и дисульфидной сшивки (Рис. 11).

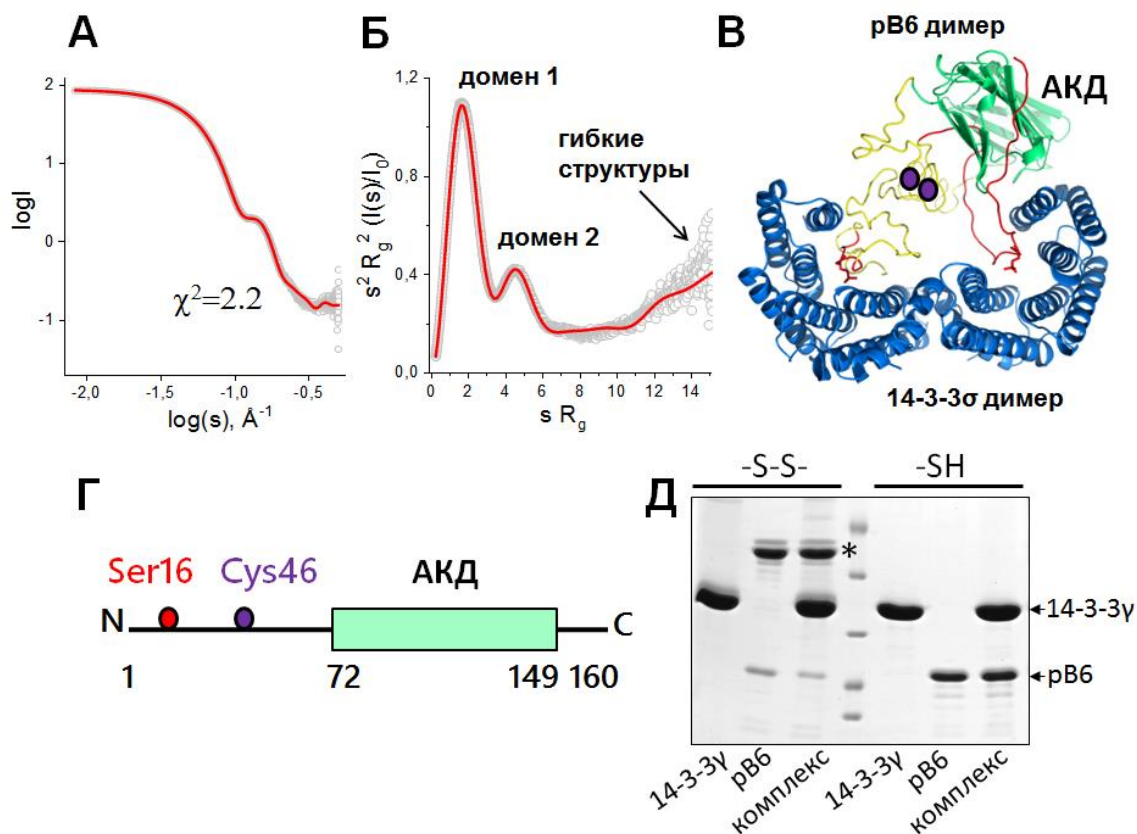


Рис. 11. Анализ структуры комплекса 14-3-3/pV6 в растворе. А. Кривая МУРР для комплекса (серые кружки), совмещенная с расчетной кривой рассеяния для полноатомной модели (красная линия). Б. Преобразование данных МУРР с помощью безразмерного графика Кратки, показывающее наличие частиц с двумя выраженными 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*. 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 в буфере без восстановителей (25°C в течение ночи) приводит к эффективному «сшиванию» остатков Cys46 как в свободном В6, так и в составе его комплекса с 14-3-3 γ (по 30 μ M каждого белка в пересчете на мономер). Положение полосы сшитого димера pV6 показано звездочкой, положения 14-3-3 и pV6 показаны стрелками справа. После восстановления образцов полосы «сшитых» димеров pV6 исчезают.

По данным ограниченного трипсинолиза, белок 14-3-3 γ практически не подвергается расщеплению и заметно снижает скорость расщепления связанного с ним pV6 (Рис. 10А). Анализ полученных продуктов протеолиза выявил накопление пептидов, соответствующих расщеплению по остаткам R13/R14, R27/R32, а также R56, расположенным в N-концевом домене В6. Это позволило провести денситометрию и охарактеризовать влияние 14-3-3 γ на кинетику изменения концентрации тех или иных продуктов расщепления В6 (Рис. 10Б). Оказалось, что 14-3-3 существенно замедляет расщепление pV6 по

положительно заряженным остаткам R13/R14 вблизи контакта с 14-3-3 в кристаллической структуре (Рис. 9), защищая эту область NTD от протеолиза. При этом присутствие 14-3-3 практически не влияет на расщепление по остаткам R27/R32 и R56 (Рис. 10Б), которые удалены от 14-3-3 в кристаллической структуре (Рис. 9).

По данным МУРР (Рис. 11А,Б), белковый комплекс 14-3-3 σ /pВ6 имеет два жестких домена и некоторое количество гибких структур. При дополнении кристаллической структуры гетеротетрамера гибкими участками, отсутствующими в картах электронной плотности (Рис. 9, около 11% массы комплекса), в программе *CORAL* мы смогли описать экспериментальную кривую МУРР (Рис. 11А) и получить полноатомную модель комплекса (Рис. 11В). В составе такой модели гибкие части NTD димера В6 формируют компактные конформации в полости 14-3-3, при которых остатки Cys46 обеих цепей могут находиться недалеко друг от друга. В качестве дополнительной проверки мы провели окисление свободного и 14-3-3-связанного pВ6 при диализе и обнаружили эффективное образование дисульфидного моста между единственными остатками Cys46 в димере pВ6 как в свободном, так и в 14-3-3-связанном виде, причем наличие 14-3-3 не снижало этой эффективности (Рис. 11Д). Аналогично можно было получить комплекс с 14-3-3 для предокисленного pВ6 (здесь не показано). Результаты сшивания согласуются с данными ограниченного протеолиза, согласно которым расщепление В6 по остатку Arg56, расположенному недалеко от Cys46, не зависит от 14-3-3 (Рис. 10).

Таким образом, конформации, наподобие показанной на Рис. 11В, могут существовать в растворе. Статистически не идеальное описание экспериментальных данных МУРР полученной моделью ($\chi^2 = 2,2$) может означать, что реальная структура более динамична. Например, нельзя исключить частичную диссоциацию АКД от 14-3-3. На это указывает неспособность изолированного АКД образовывать комплекс с 14-3-3 σ (Рис. 7). Скорее всего, АКД слабо взаимодействует с 14-3-3 σ даже в составе

полноразмерного комплекса. В итоге был установлен молекулярный механизм взаимодействия 14-3-3 с pB6, включающий несколько этапов (Рис. 12).

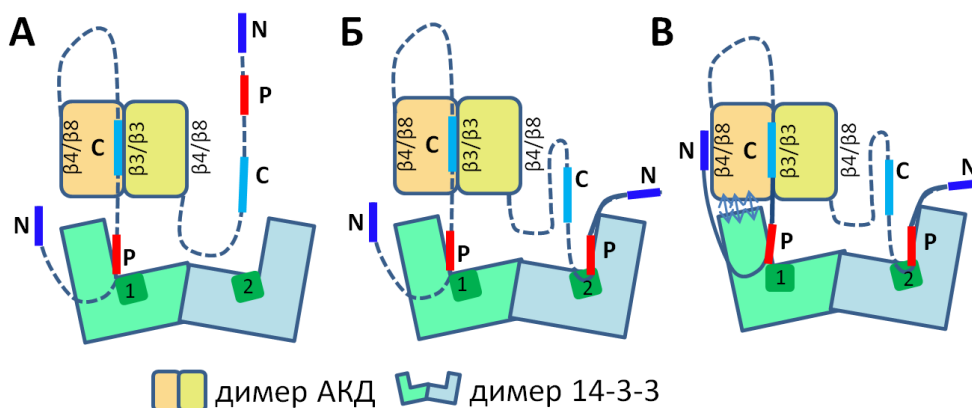


Рис. 12. Предполагаемый механизм формирования регуляторного комплекса 14-3-3/pB6. Ключевые области NTD белка B6 обозначены следующим образом: N, N-концевая область (остатки 1-10); P, 14-3-3-связывающая область (остатки 13-20), включающая pSer16; C, центральный консервативный участок (остатки 27-34). Одна из двух центральных областей C может занимать $\beta 3/\beta 3$ -канавку димера АКД даже в свободном состоянии В. 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. Слабое связывание АКД с 14-3-3 стабилизировано за счет взаимодействия N-концевого пептида B6 с $\beta 4/\beta 8$ бороздкой АКД.

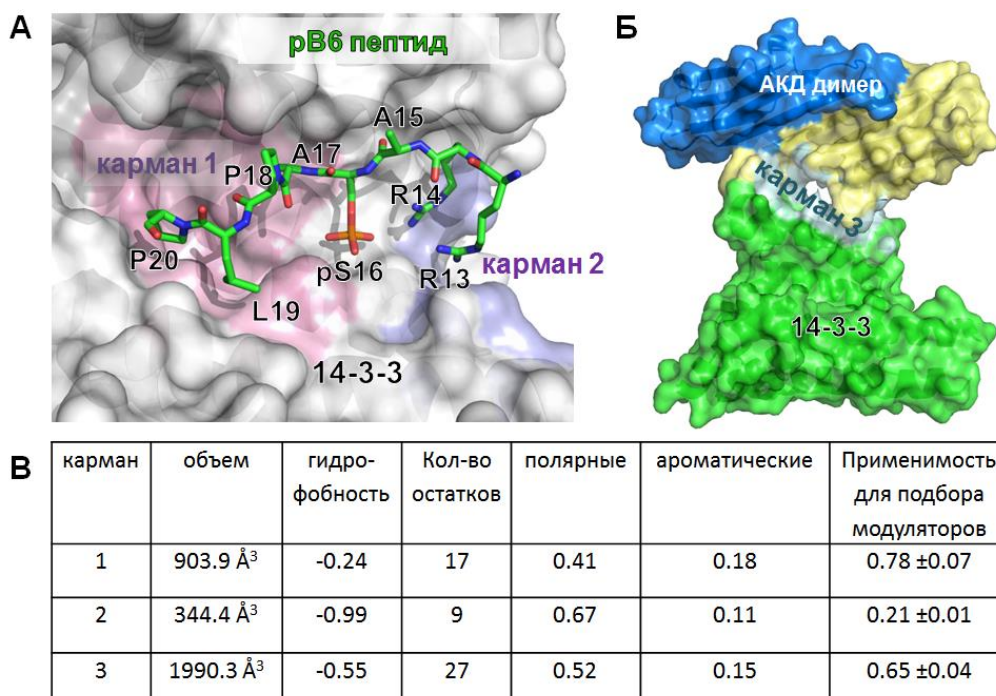


Рис. 13. Потенциальные «карманы» для связывания модуляторов взаимодействия белков 14-3-3σ и pB6. А. Интерфейс в АБ 14-3-3σ оставляет два кармана (окрашены в розовый и фиолетовый цвета) на каждом конце связанного фосфопептида (зеленый), из которых карман 1 особенно перспективен. Б. Еще один карман (карман 3, голубой) находится в интерфейсе 14-3-3σ/АКД. В. Параметры карманов, обнаруженных с помощью сервера *PockDrug* (<http://pockdrug.rpbs.univ-paris-diderot.fr>). Более высокое значение в правом столбце говорит о большей перспективности.

Располагая моделью полного комплекса, мы проанализировали применимость структуры для разработки низкомолекулярных модуляторов с помощью *PockDrug* (Рис. 13). Такой подход, основанный на поиске в интерфейсах комплексов полостей, которые содержали бы сочетание гидрофобных и полярных аминокислотных остатков, позволил обнаружить три «кармана», в разной степени удовлетворяющих этим требованиям (Рис. 13А-В).

2. Разработка методов, облегчающих структурные исследования комплексов 14-3-3

2.1. Получение фосфорилированных белков при ко-экспрессии с РКА

Исследования комплексов 14-3-3 с фосфорилированными белками-партнерами затруднены из-за сложности стехиометрического фосфорилирования 14-3-3-связывающих сайтов, а также их предпочтительным расположением в протяженных неструктурированных областях [11]. 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. Ввиду этого, представлялось целесообразным разработать новые подходы, которые облегчали бы такие исследования.

Для получения структуры комплекса 14-3-3/pB6 ранее мы использовали препарат B6, фосфорилированный по Ser16 при ко-экспрессии с РКА в *E.coli*, а затем очищенный без использования тагов. Для того чтобы сделать процедуру более удобной и универсальной, мы оптимизировали систему ко-экспрессии белка-партнера 14-3-3 с протеинкиназой, использовав для этого другой партнер – структурно-разупорядоченный Тау белок человека, который связан с развитием болезни Альцгеймера [12]. В такой системе Тау белок содержал на N-конце гексагистидиновый таг, отщепляемый специфичной 3С протеазой, и мог быть получен в фосфорилированной форме в отсутствие (двойная ко-экспрессия с РКА) или в присутствии 14-3-3σΔС (тройная ко-экспрессия). 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 протеинкиназа или другая изоформа 14-3-3).



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

Полученный в результате двойной ко-экспрессии Тау белок был полифосфорилированным («pTau^{coex}»), что согласуется с наличием в его последовательности до 20% остатков, являющихся участками фосфорилирования для различных протеинкиназ [12]. Анализ трипсинолизата pTau^{coex} с помощью масс-спектрометрии позволил установить семь фосфорилированных участков (Рис. 14А), фосфорилирование которых показано *in vivo* [13]. Некоторые из этих участков описаны в литературе как 14-3-3-

связывающие (Рис. 14Б) [14], а некоторые потенциально являются таковыми, но не были описаны в контексте связывания 14-3-3 (например, остаток Ser187, фосфорилируемый под действием ROCKII киназы [15]). Tau белок, фосфорилированный при ко-экспрессии с РКА, показал способность прочно взаимодействовать с белками 14-3-3 разного типа (Рис. 15А,Б). Использование тройной ко-экспрессии с РКА и 14-3-3 $\sigma\Delta\text{C}$ позволило выделить и очистить комплекс 14-3-3 $\sigma\Delta\text{C}$ /pTau, который при хроматографии очищался как одно целое и имел подвижность при нативном электрофорезе неотличимую от подвижности комплекса, сформированного из белков, очищенных отдельно (здесь не показано). Таким образом, мы показали, что ко-экспрессия с протеинкиназой может быть полезным инструментом для получения фосфорилированного белка, способного связываться с белками 14-3-3. Использование тройной ко-экспрессии для получения готовых комплексов 14-3-3, вероятно, подходит только для белков-партнеров с особенно высоким сродством к 14-3-3.

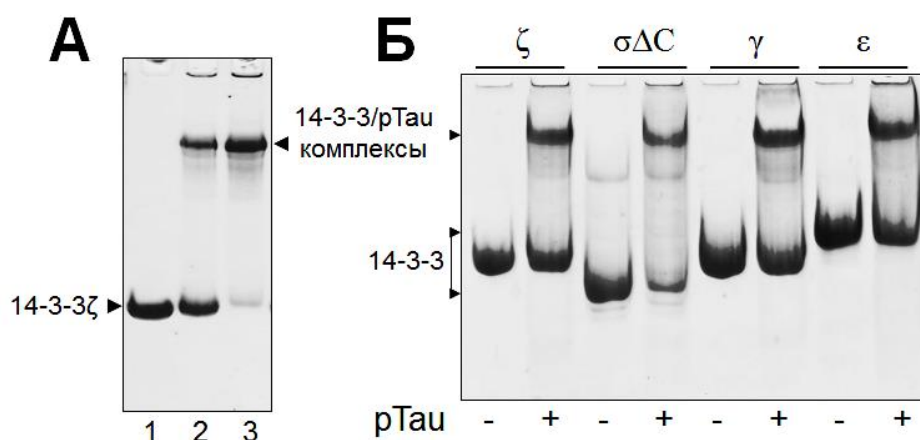


Рис. 15. Подтверждение взаимодействия между pTau^{coex} и 14-3-3 ζ с помощью нативного гель-электрофореза. А. Нативный гель-электрофорез 14-3-3 ζ (дорожка 1) или его смеси с 1х (дорожка 2) или 2х (дорожка 3) концентрацией pTau^{coex}. Полоса свободного 14-3-3 исчезает за счет образования полосы с более низкой подвижностью, которая соответствует его комплексу с pTau (последний имеет pI > 9 и не входит в гель при pH 8,6). Б. Взаимодействие различных изоформ 14-3-3 и pTau^{coex} по данным нативного гель-электрофореза. Нечетные дорожки – 14-3-3 изоформы, четные – их смеси с pTau^{coex}. Верхние полосы соответствуют комплексам 14-3-3/pTau (показаны стрелкой).

Мы применили сходный подход 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 [16]. Этот белок связывает липиды и обладает плохой растворимостью, поэтому нам пришлось разработать систему его получения в виде фьюжн-конструкции с мальтозо-связывающим белком (MBP) (Рис. 16А). MBP, несущий гис-таг и отщепляемый от последовательности STARD1 под действием 3С протеазы, позволял провести эффективную очистку растворимого STARD1 (Рис. 16Б,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. 16Г).

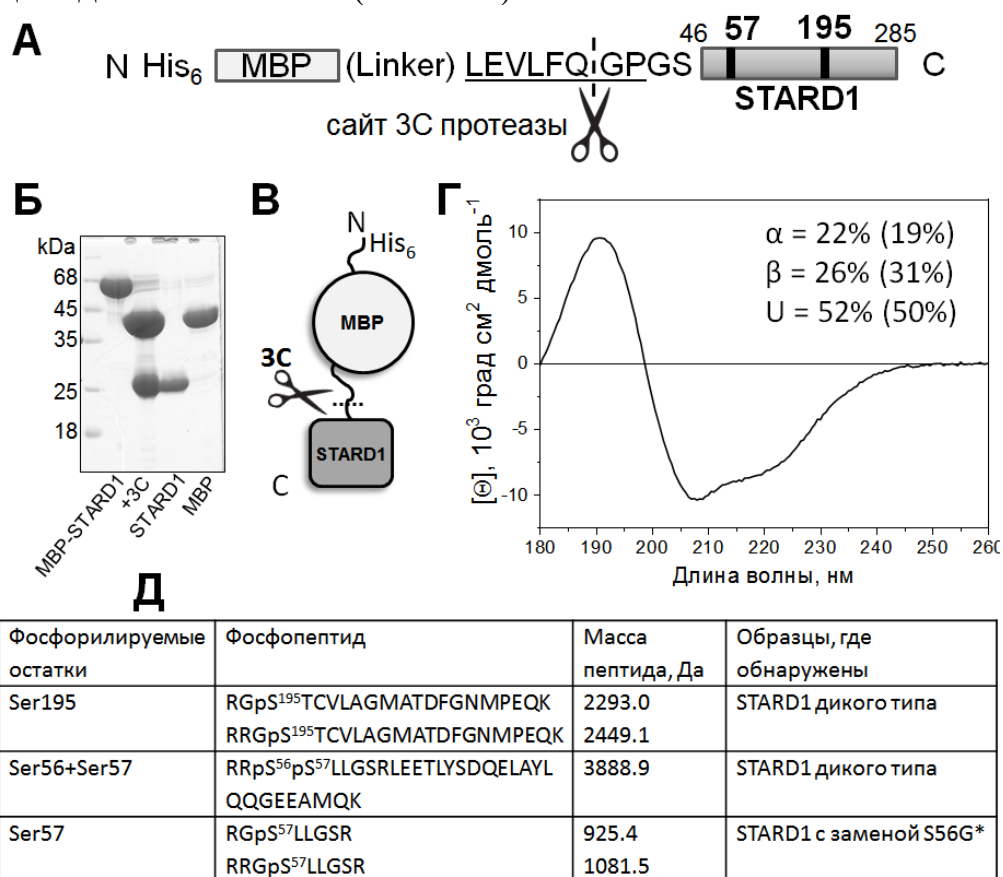


Рис. 16. Получение фосфорилированного белка STARD1 человека при ко-экспрессии с PKA. А. Дизайн конструкции для бактериальной экспрессии STARD1, состоящей из MBP, отщепляемого от последовательности STARD1, расположенной на С-конце, с помощью 3С протеазы. Два основных остатка фосфорилирования PKA, Ser57 и Ser195, отмечены. Б. ДСН-электрофореграмма, показывающая возможность расщепления фьюжн-конструкции с отделением свободного STARD1 от MBP и PKA, 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 3POL, доли соответствующих структур указаны в скобках). Д. Идентификация фосфорилирования остатков Ser57 и Ser195 в STARD1 при его ко-экспрессии с PKA, по данным масс-спектрометрии. Было обнаружено фосфорилирование полуконсервативного Ser56 наряду с целевым Ser57, что эффективно устранялось заменой Ser56 на Gly или Ala. *Приведены данные только для S56G замены.

При ко-экспрессии STARD1 с PKA мы подтвердили фосфорилирование консервативных остатков Ser57 и Ser195, известное из литературы [17], а также фосфорилирование остатка Ser56, соседнего с Ser57 (Рис. 17Д). Остаток Ser56 является полуконсервативным (например, у овечьего гомолога на его месте стоит Gly) и, будучи фосфорилирован, может негативно влиять на связывание с 14-3-3. Поэтому наряду с белком дикого типа мы получили мутантные формы с заменами S56G и S56A, в которых обнаружилось фосфорилирование только по Ser57 и Ser195 (Рис. 16Д). Дважды фосфорилированный белок STARD1 был способен взаимодействовать с белками 14-3-3 (здесь не показано). Поскольку участки Ser57 и Ser195 располагаются в последовательностях, отличных от консенсусных, исследование взаимодействия 14-3-3 с STARD1 расширило наши представления о селективности 14-3-3 при связывании лигандов.

2.2. Дизайн химерных конструкций белков 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 существенными ограничениями. В качестве альтернативного подхода мы предположили использование химерных конструкций, состоящих из 14-3-3 и последовательности фосфорилируемого пептида, соединенных коротким гибким линкером (Рис. 17). Такой подход был вдохновлен редкой конформацией 14-3-3 из *Cryptosporidium parvum* (код PDB 3EFZ, Рис. 17А). В этой структуре остаток Ser собственного С-концевого пептида был спонтанно фосфорилирован при экспрессии в *E.coli*, и, вследствие этого, канонически связан в АБ 14-3-3. Это позволяло оценить длину линкера, необходимого для успешного создания искусственных химер 14-3-3 (Рис. 17Б,В). 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. 17В).

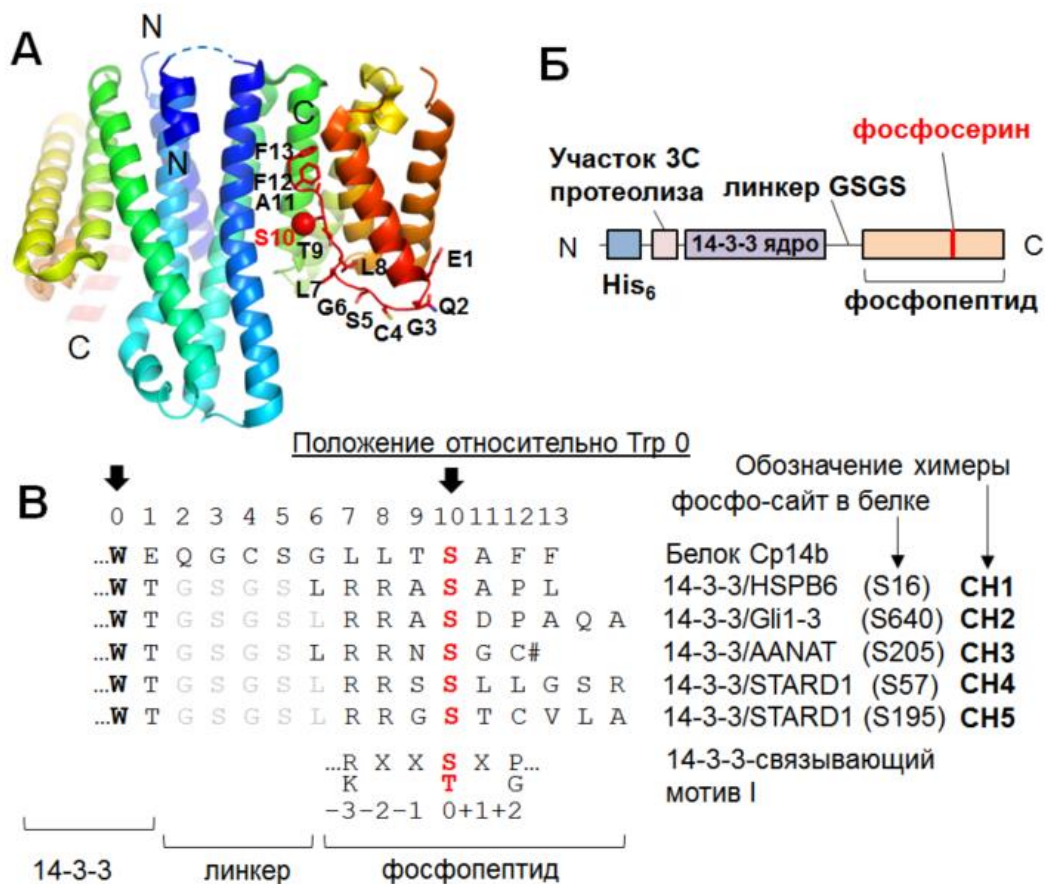


Рис. 17. Дизайн химер 14-3-3 с фосфопептидами белков-партнеров. А. Прототипная кристаллическая структура 14-3-3 из *C. parvum* (Cp14b) с фосфорилированным гибким С-концевым пептидом (пронумерованные остатки), связанным в АБ одной субъединицы 14-3-3 (код PDB 3EFZ). Каждая субъединица окрашена градиентом от N (синий) до С-конца (красный). Б. Схематическое изображение химеры, несущей на N-конце гис-таг, отщепляемый 3С протеазой. В. Выравнивание С-концевых областей Ср14б и химер СН1-СН5, показывающее линкер, соединяющий консервативный Тгр 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 качестве основы была взята 14-3-3σ изоформа, поскольку в ней остаток в положении 58, фосфорилируемый РКА в составе других изоформ [18], представлен аланином. Для увеличения кристаллизуемости в составе 14-3-3σ были проведены замены остатков ⁷⁵ЕЕК⁷⁷ на аланины, а на N-конце размещен отщепляемый гис-таг для облегчения очистки (Рис. 17Б). Вначале была получена химера 14-3-3σ с пептидом В6 в нефосфорилированном (СН1) и фосфорилированном виде (рСН1), и проведена ее характеристика (Рис. 18). Фосфорилирование СН1 сопровождалось характерным сдвигом полосы вниз

при нативном электрофорезе, а дефосфорилирование приводило к обратному эффекту (вставка на Рис. 18А). В то время как СН1 была представлена одиночным пиком при ГФ с размером, соответствующим димеру белка (радиус Стокса 3,6 нм), на профиле элюции рСН1 наблюдался также небольшой пик, соответствующий тетрамеру, а пик димера был немного сдвинут вправо (радиус Стокса 3,4 нм, Рис. 18А). Мы предположили, что такая компактизация обусловлена связыванием С-концевых фосфопептидов с АБ 14-3-3, а тетрамерная форма стабилизируется за счет реципрокного взаимодействия фосфопептидов от двух разных димеров. Изменение конформации химеры при фосфорилировании было подтверждено при исследовании термостабильности белка по его триптофановой флуоресценции (Рис. 18Б). В случае рСН1 мы наблюдали заметно более высокую температуру полуперехода (70°C) по сравнению с СН1 (65°C) и 14-3-3σΔС (61°C), что подтверждало связывание фосфопептидов в АБ и предлагало удобный способ проверки правильности сборки химер перед их кристаллизацией в дальнейшем.

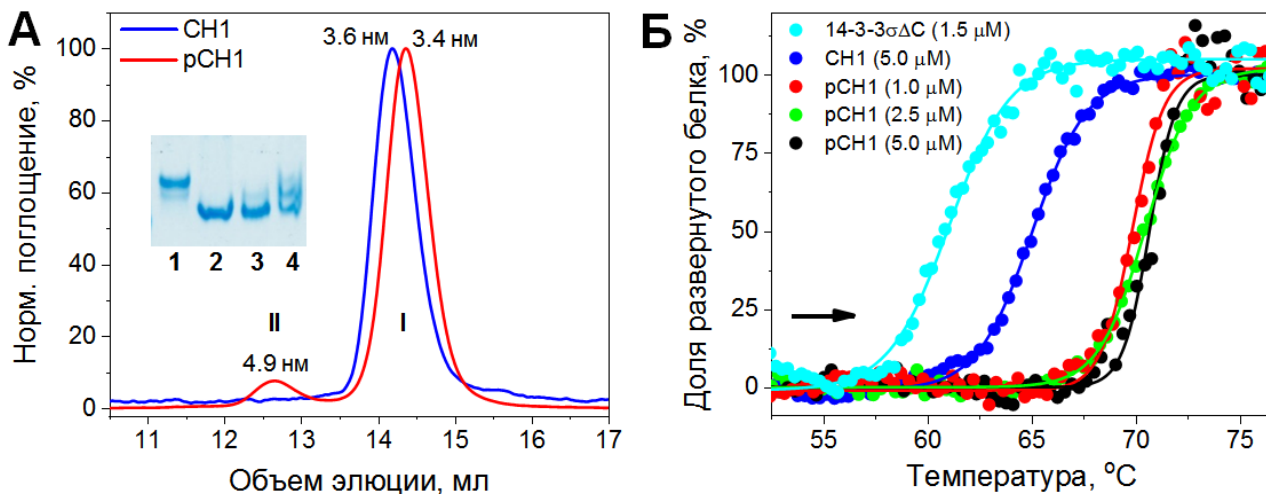


Рис. 18. Характеристика химеры СН1. А. Профили ГФ химеры 14-3-3σ с фосфопептидом В6, экспрессированной в отсутствие (СН1) или в присутствии (рСН1) РКА, полученные с использованием колонки Superdex 200 Increase и нормализованные в максимуме. Указаны радиусы Стокса, соответствующие максимумам пиков и полученные из калибровки колонки. Пики димеров (I) и тетрамеров (II) СН1 отмечены. На вставке показана миграция СН1 (1), СН1, ко-экспрессированного с РКА (2) или фосфорилированного РКА *in vitro* (3), или рСН1, дефосфорилированного щелочной фосфатазой *in vitro* (4), при нативном гель-электрофорезе. 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°C с постоянной скоростью 1°C/мин (направление показано стрелкой), показывающая эффект фосфорилирования на положение теплового перехода.

2.3. Кристаллические структуры химер белков 14-3-3 с фосфорилированными фрагментами белков-партнеров

Все варианты химер 14-3-3 были закристаллизованы, причем кристаллы, полученные уже при первом скрининге, были пригодны для РСА, не требуя трудоемкой оптимизации. Это является большим преимуществом нового подхода и позволяет использовать его в широкопоточном формате в будущем.

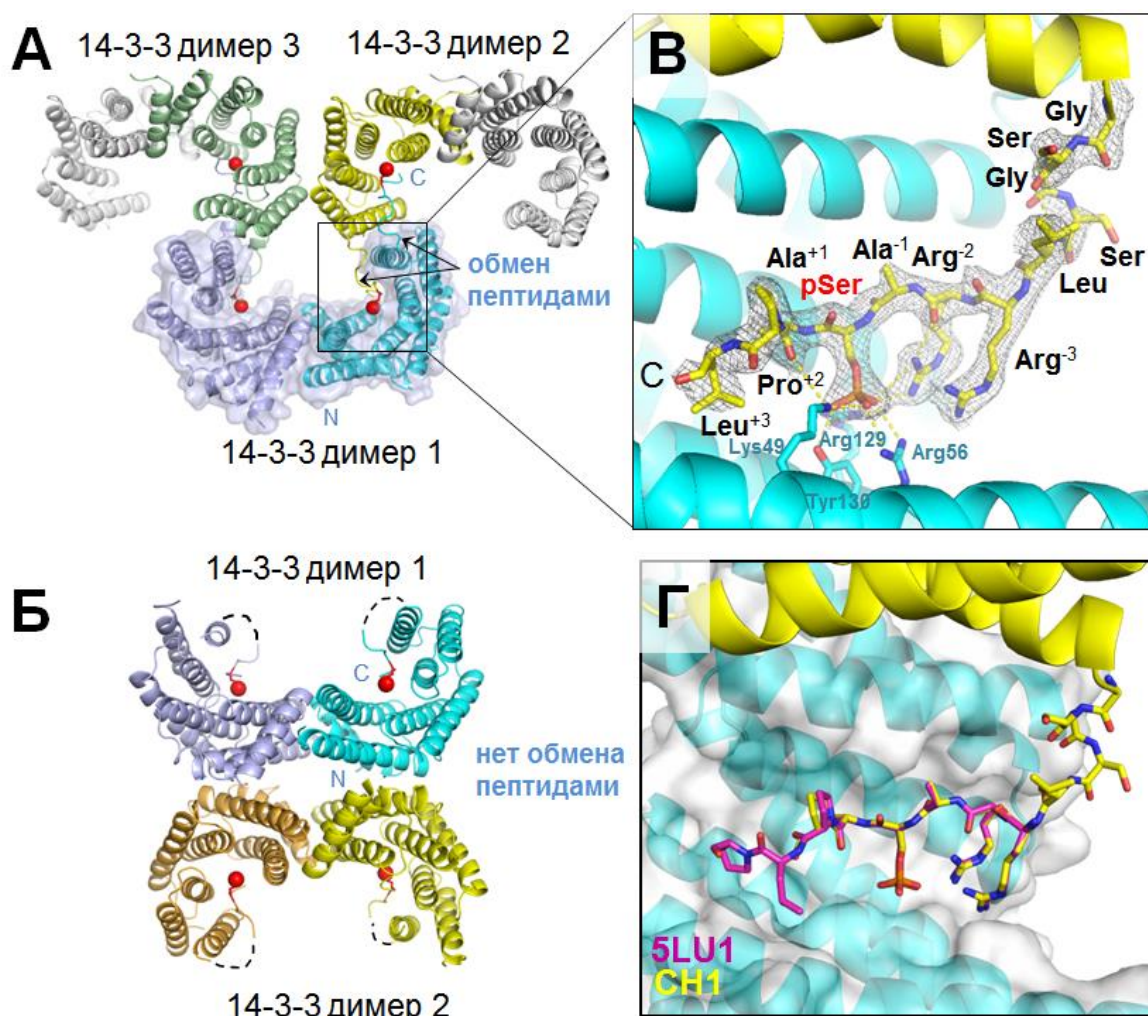


Рис. 19. Кристаллические структуры химеры 14-3-3σ с фосфопептидом В6. А. Кристаллическая упаковка с обменом фосфопептидами (красные) между мономерами двух соседних 14-3-3 димеров (код PDB 5OK9, разрешение 2,35Å). Физиологический димер 14-3-3 выделен полупрозрачной поверхностью. Б. Кристаллическая упаковка без обмена фосфопептидами (код PDB 5OKF, разрешение 3,2Å). Пунктирные линии соответствуют неразрешенным частям линкера. В. Конформация линкера и фосфопептида показана с электронной плотностью 2Fo-Fc, имеющей контур 1σ (остатки помечены цифрами, указывающими положения относительно pSer). Г. Сравнение конформации фосфопептида в структуре, полученной с помощью химеры, и конформации синтетического пептида, кокристаллизованного с 14-3-3σ (код PDB 5LU1).

Химера pCH1 была закристаллизована в двух формах, представленных на Рис. 19, одна из которых была стабилизирована необычным связыванием

фосфопептидов между соседними димерами 14-3-3 (Рис. 19А), а в другой связывание фосфопептидов происходило в АБ тех же субъединиц, которым они принадлежали (Рис. 19Б). Очевидно, что в обоих случаях достигается необходимая цель, и обе кристаллические структуры несут эквивалентную структурную информацию по взаимодействию фосфопептидов с 14-3-3, а вариации кристаллических форм только увеличивают шансы на получение этой информации. Так, химера рСН1 позволила выявить интересующий нас молекулярный интерфейс (Рис. 19В). Принципиально важно, что конформация пептида, ковалентно присоединенного к 14-3-3 σ , была практически идентична ($C\alpha$ R.M.S.D. 0,23Å) той, которая была получена нами ранее при ко-кристаллизации 14-3-3 с синтетическим фосфопептидом В6 (Рис. 19Г).

Аналогично были получены кристаллические структуры химер 14-3-3 σ с фосфопептидами других физиологически значимых белков-партнеров 14-3-3 – транскрипционного фактора Gli (разрешение 3,2Å) и фермента регуляции циркадных ритмов AANAT (разрешение 3,0Å) (здесь не показаны).

Также были получены структуры химер 14-3-3 σ с двумя фосфопептидами белка STARD1 вокруг остатков Ser57 и Ser195, фосфорилируемых PKA [17] (Рис. 20 и 21). Оба фосфопептида субоптимальны для связывания 14-3-3, поскольку лишены остатка Pro или Gly в положении +2 относительно pSer. Последовательность Ser57-фосфопептида STARD1 RRSpS⁵⁷LLGSR почти идентична таковой в фосфопептидах RRSpS⁸⁷LLSRS в проапоптотическом человеческом Bcl-2-подобном белке 11 (код Uniprot O43521) и RRSpS⁴³⁵LLSLM в белке 1, взаимодействующем с семейством RAB11 (код Uniprot Q6WKZ4), что представляется редким случаем среди описанных в литературе партнеров 14-3-3. Ввиду сходства центральных участков (подчеркнуты выше), можно ожидать, что полученная нами структура на Рис. 20 репрезентативна для взаимодействия 14-3-3 сразу с тремя разными белками-партнерами. Структура химеры с Ser195-фосфопептидом STARD1 еще более примечательна, поскольку в ней в двух мономерах одного димера 14-3-3 фосфопептиды связаны в двух сильно отличающихся конформациях – вытянутой и изогнутой (Рис. 21).

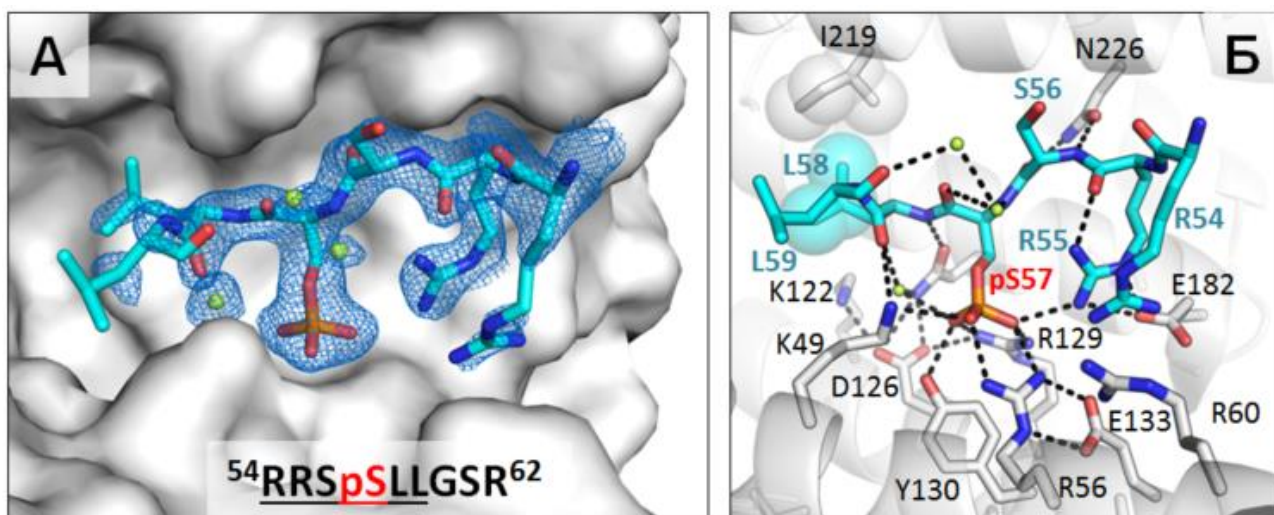


Рис. 20. Кристаллографический интерфейс 14-3-3σ и Ser57-фосфопептида STARD1 (код PDB 6T5H, разрешение 2,0 Å). А. Конформация пептида (голубой) в АБ 14-3-3 (серая поверхность) показана с картой электронной плотности 2Fo-Fc (контур 1σ). Молекулы воды отмечены зеленым. Остатки фосфопептида, подтвержденные 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).

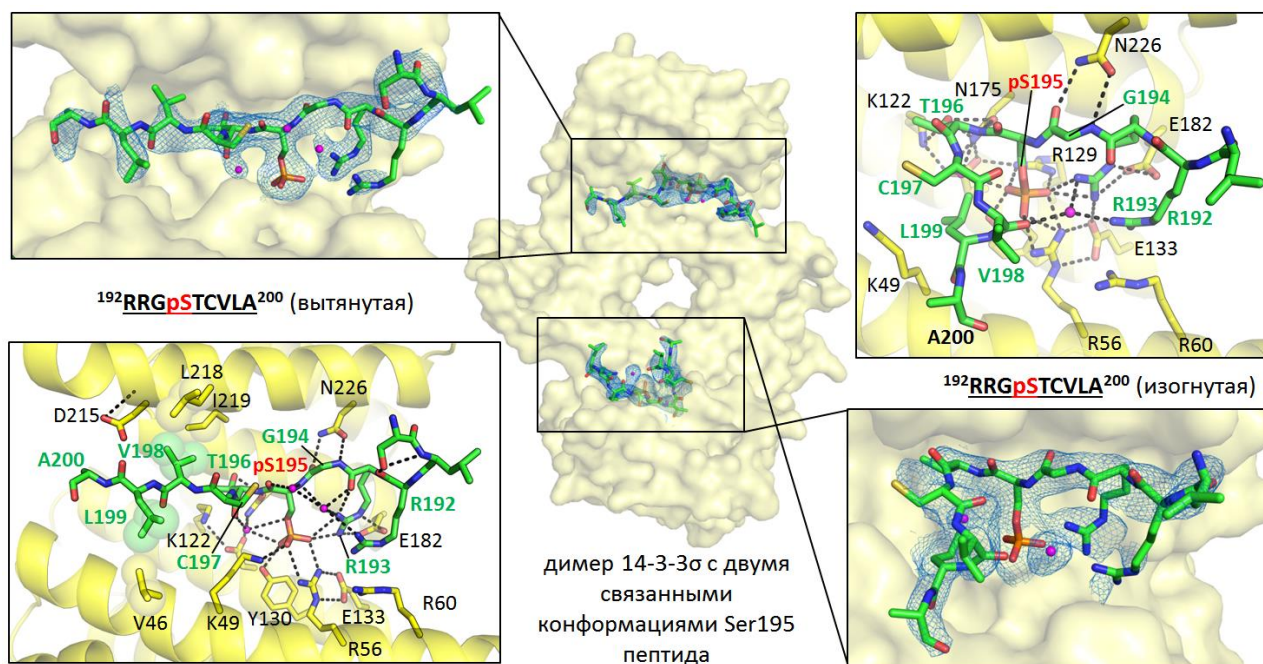


Рис. 21. Кристаллографический интерфейс 14-3-3σ с Ser195-фосфопептидом STARD1 (код PDB 6T5F, разрешение 2,6 Å) в двух разных конформациях (в центре). Слева – связывание вытянутой, справа – изогнутой конформации фосфопептида (зеленый). Электронная плотность 2Fo-Fc, соответствующая фосфопептиду, имеет 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.

Полученное разрешение (2,6Å) позволяет проследить контакты, стабилизирующие обе конформации, при этом вытянутая конформация кажется

более выгодной, поскольку усилена гидрофобными взаимодействиями дипептида V198-L199 с остатками L218, I219 и V46 со стороны 14-3-3 (Рис. 21). Наличие двух конформаций одного 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 3P0L). Очевидно, что для полноценного связывания в АБ 14-3-3, этот сегмент должен развернуться (Рис. 22), что, по всей видимости, имеет место при функционировании STARD1 и его импорте в митохондрии при стероидогенезе [16]. Ввиду того, что Ser195-фосфопептид связывается канонически в АБ 14-3-3, можно предположить, что его пластичность необходима для своего рода условного (conditional) связывания с 14-3-3 (то есть для связывания должна поменяться конформация 14-3-3-связывающего участка).

Применимость химерного подхода была показана нами также для других изоформ 14-3-3. Так, была получена химера на основе 14-3-3 ζ и фосфопептида проапоптотического белка BAD, которая была выделена, очищена и закристаллизована в форме, не имеющей тагов (здесь не показано).

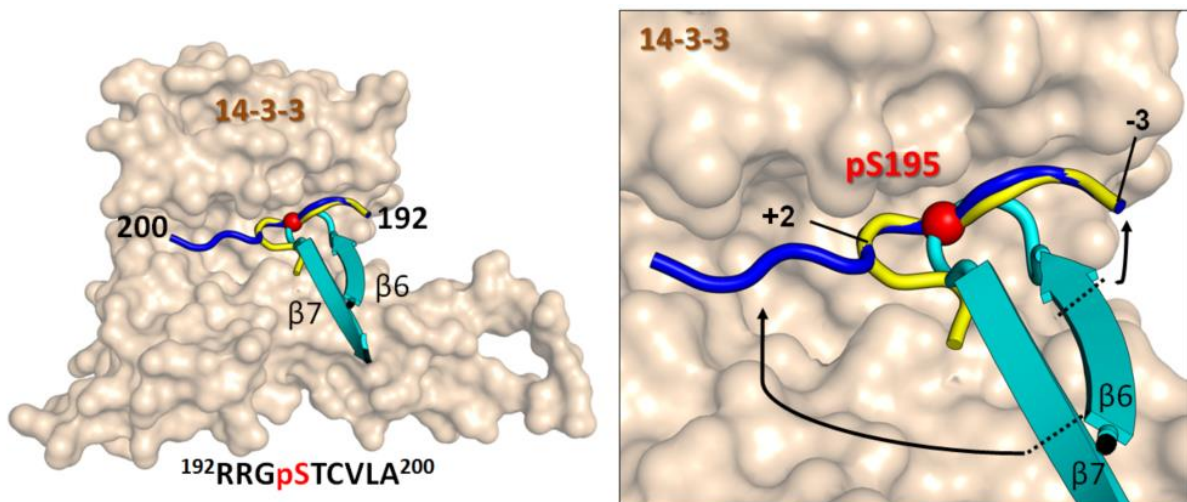


Рис. 22. Сравнение конформации Ser195-фосфопептида STARD1 в свободном и 14-3-3-связанном состояниях. Две конформации фосфопептида, наблюдаемые в комплексе с 14-3-3, совмещены с конформацией этого сегмента в нативном белке STARD1, где он является частью шпильки $\beta 6/\beta 7$ (код PDB 3P0L). Слева, 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 $\beta 6/\beta 7$ для принятия вытянутой конформации и создания условий для взаимодействия с 14-3-3. Указаны положения Ca атомов ключевых 14-3-3-связывающих аминокислот в положениях -3 и +2 относительно центрального фосфосерина (красный).

2.4. Применение химерных конструкций 14-3-3 с фосфопептидом онкобелка

Е6 вируса папилломы человека

Отработав дизайн химер на основе 14-3-3 ζ , мы перешли к решению с их помощью фундаментальной задачи. По данным литературы, 14-3-3 ζ является партнером онкобелка Е6 вируса папилломы человека (HPV), который ускоряет деградацию проапоптотических белков клетки хозяина, провоцируя развитие многих видов рака, в том числе рака шейки матки – основной причины смертности женщин во всем мире. Было показано взаимодействие 14-3-3 ζ с Е6 одного из наиболее распространенных подтипов, HPV18 [19]. Причем за связывание с 14-3-3 отвечает С-концевой мотив Е6 с двойной специфичностью. В зависимости от фосфорилирования под действием базофильных киназ (например, PKA и PKB/Akt), он способен связываться либо с PDZ-доменами белков клетки хозяина (когда нефосфорилирован), либо с белками 14-3-3 (когда фосфорилирован) [19]. Ввиду наличия такой регуляции комплекс Е6 с 14-3-3 представляет интерес для разработки низкомолекулярных соединений, препятствующих развитию папилломавирусных инфекций.

Для получения структуры комплекса мы создали химеру 14-3-3 ζ с фосфопептидом HPV18Е6, соединенным с 14-3-3 ζ линкером GGGG. Такой белок был ко-экспрессирован с PKA, очищен и кристаллизован. Структура (Рис. 23А,Б) показала многоточечное взаимодействие 14-3-3 с наименее охарактеризованным, III типом фосфопептидов, которые располагаются в самом С-конце белков-партнеров 14-3-3 (Рис. 23В). Отдельно была получена ко-кристаллическая структура 14-3-3 σ с синтетическим фосфопептидом от Е6 из наиболее распространенного подтипа HPV16. Несмотря на более низкое разрешение (2,8Å), вся конформация пептида четко прослеживалась в АБ 14-3-3. Важно, что конформации основной цепи пептидов Е6 от двух разных HPV типов (16 и 18), закристаллизованные с разными изоформами 14-3-3 с помощью альтернативных подходов, были практически идентичными (Са R.M.S.D. 0,17Å, Рис. 23Г), что в очередной раз доказывало состоятельность предложенного и разработанного нами «химерного» подхода.

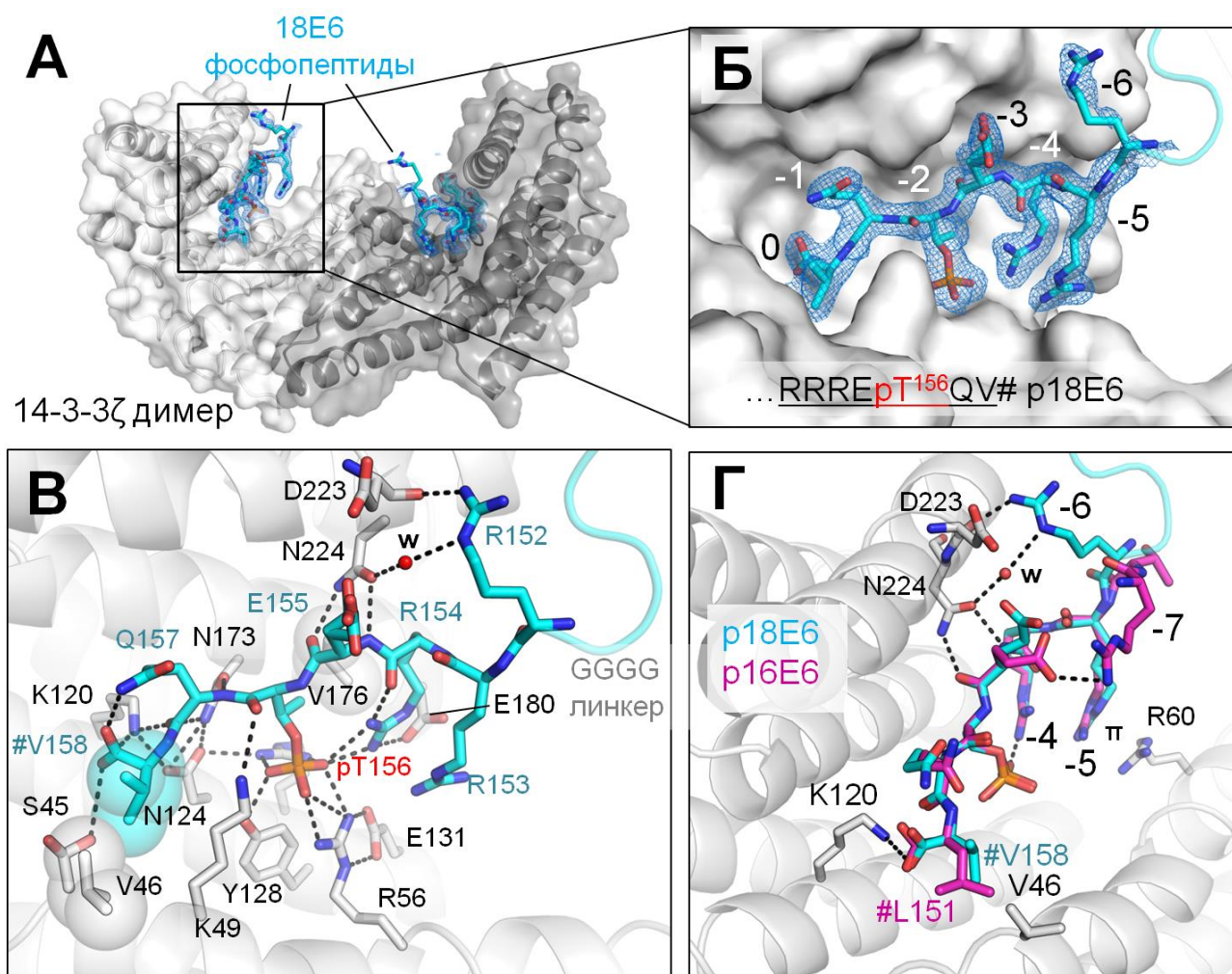


Рис. 23. Молекулярный интерфейс между 14-3-3ζ и фосфопептидом 18E6 (код PDB 6ZFD, разрешение 1,9 Å). А. Общий вид димера 14-3-3ζ (субъединицы показаны оттенками серого) с двумя связанными фосфопептидами 18E6 (голубые). Б. Конформация фосфопептида 18E6 в амфипатической бороздке 14-3-3ζ с 2Fo-Fc картой электронной плотности (контур 1σ). В. Полярные контакты (пунктирные линии) и гидрофобные взаимодействия (полупрозрачные сферы), стабилизирующие конформацию связанного пептида 18E6. Г. Наложение двух 14-3-3-связанных фосфопептидов из 16E6 (код PDB 6TWZ, разрешение 2,8 Å) и 18E6 (код PDB 6ZFD, разрешение 1,9 Å), показывающее сходство конформации. # обозначает С-конец. w – молекула воды.

Для того чтобы проверить применимость химеры 14-3-3 для получения «тройных» комплексов с фосфопептидами в присутствии молекул-модуляторов, мы получили структуру комплекса химеры 14-3-3ζ-18E6 с широко используемым стабилизатором комплексов 14-3-3, токсином фузикоцином (Fc) [3]. Структура комплекса 14-3-3ζ/18E6/Fc (Рис. 24А,Б) позволила идентифицировать необычный, умеренно дестабилизирующий эффект Fc, который связывался в описанном ранее кармане в амфипатической

бороздке 14-3-3 (Рис. 24В,Г). До нас дестабилизирующее действие Fc было показано лишь для единичных фосфопептидов I или II, но не III типа [20].

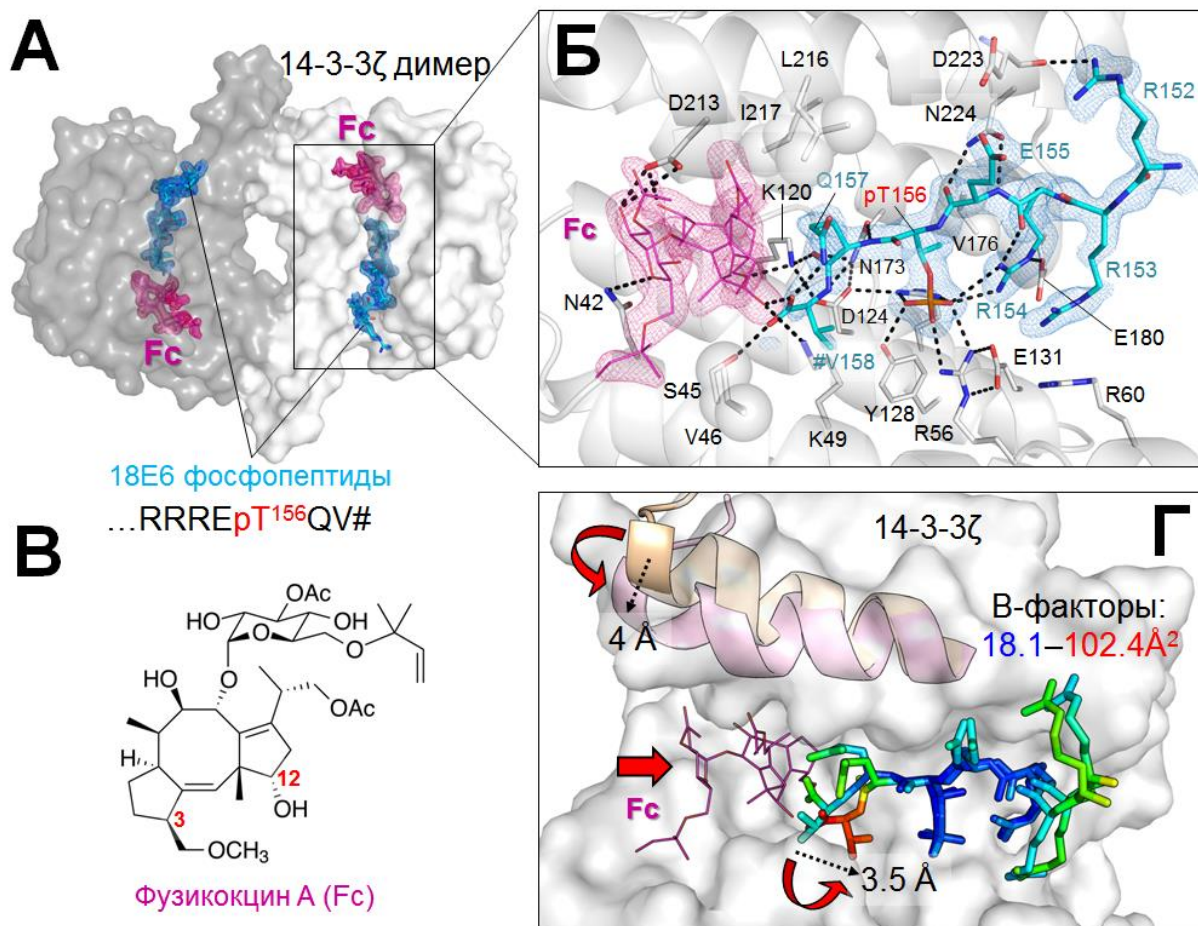


Рис. 24. Структурная основа эффекта Fc на взаимодействие 14-3-3 ζ с фосфопептидом 18E6 (код PDB 6ZFG, разрешение 1,85Å). А. Общий вид тройного комплекса между 14-3-3 ζ (субъединицы показаны двумя оттенками серого), фосфопептида 18E6 (голубой) и Fc (розовый). Б. Полярные контакты (пунктирные линии) и 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 (1 σ) показаны для пептида и Fc. # обозначает 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 конформационных изменений в Å показаны пунктирными стрелками.

Связывание Fc вызывает заметное конформационное изменение С-концевой α -спирали 14-3-3 и из-за стерического наложения приводит к смещению С-концевой карбоксигруппы фосфопептида, нарушая ее полярный контакт с остатком K120 в 14-3-3. Это значительно увеличивает В-факторы последних двух остатков фосфопептида и делает весь комплекс менее монолитным (Рис. 24Г). Мы подтвердили сходное ~1,5-2-кратное снижение

аффинности в присутствии Fc для синтетических фосфопептидов E6 из разных NPV штаммов *in vitro* (здесь не показано). Таким образом, химеры 14-3-3 применимы к структурным исследованиям не только комплексов 14-3-3 с фосфопептидами, но и тройных комплексов с соединениями-модуляторами.

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

3.1. Получение и характеристика мономерной мутантной формы 14-3-3

Большинство функций требует димерной структуры 14-3-3, однако известно, что продукты альтернативного сплайсинга некоторых изоформ 14-3-3, укороченные с N-конца, являются мономерными и сохраняют некоторую функциональность [21]. Нельзя исключить наличия у мономеров уникальных свойств, однако проверка этой гипотезы невозможна без получения и характеристики мономеров. Помимо альтернативного сплайсинга, известно, что фосфорилирование Ser58 нескольких изоформ 14-3-3 (например, 14-3-3ζ) дестабилизирует димер и провоцирует его диссоциацию [18]. Фосфорилирование Ser58 в димере затруднено его расположением в области димеризации, поэтому такая модификация не может быть использована для получения мономеров 14-3-3 и исследования их свойств [22]. В этой связи, для получения мономеров белка мы получили серию мутантных форм с заменами в области димеризации (Рис. 25).

Только мутантные формы с заменами 3 (WMW) или 4 (MMW) остатков были растворимы при экспрессии в *E.coli*. Белки были выделены, очищены и детально охарактеризованы. В отличие от мутантной формы S58E, димеры которой обратимо диссоциируют при разведении [22], оба новых белка соответствовали мономерным формам 14-3-3ζ в широком диапазоне концентраций (Рис. 26А), а их молекулярная масса $28,4 \pm 0,3$ кДа (Рис. 26Б) соответствовала ожидаемой для мономера (27,4 кДа). Это послужило важной предпосылкой анализа физико-химических свойств и структуры мономеров.

Оба мономерных 14-3-3 имели сниженную термостабильность (температура полуперехода 52-53°C) по сравнению с белком дикого типа

(61,2°C) и белком S58E (59°C) (Рис. 26В). С помощью титрования флуоресцентным зондом бис-АНС мы показали, что обе мономерные мутантные формы обладают значительно более выраженной поверхностной гидрофобностью по сравнению с димерным белком (Рис. 26Г). По всей видимости, это связано с экспонированием двух гидрофобных кластеров, которые в димерном белке скрыты в интерфейсе и стабилизируют его (Рис. 26Г).

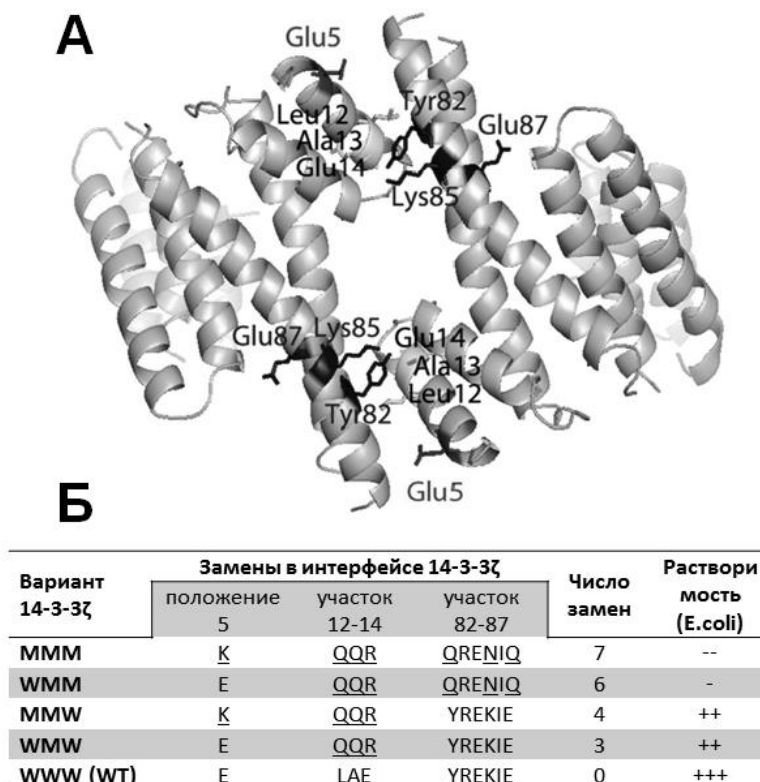


Рис. 25. Дизайн мутантных форм 14-3-3ζ, не способных к димеризации. А. Положение 7 остатков, расположенных в интерфейсе димеров 14-3-3ζ (код PDB 1A4O), мутирование которых дает вариант MMM. Мутированные остатки расположены в трех участках – остаток 5, остатки 12-14 и остатки 82-87. Б. Номенклатура полученных вариантов 14-3-3ζ. Мутированные остатки подчеркнуты, указана растворимость при экспрессии в *E.coli*.

Неудивительно, что при экспонировании большой поверхности и при сниженной термостабильности мономер 14-3-3ζ обладал заметно более низкой устойчивостью к протеолизу под действием трипсина и химотрипсина (здесь не показано). Такая картина говорит о том, что фосфорилирование и диссоциация 14-3-3 может быть одним из механизмов деградации и ликвидации белков 14-3-3. В то же время, нельзя исключить, что скрытые в интерфейсе области участвуют в выполнении альтернативных функций, выраженных у мономеров.

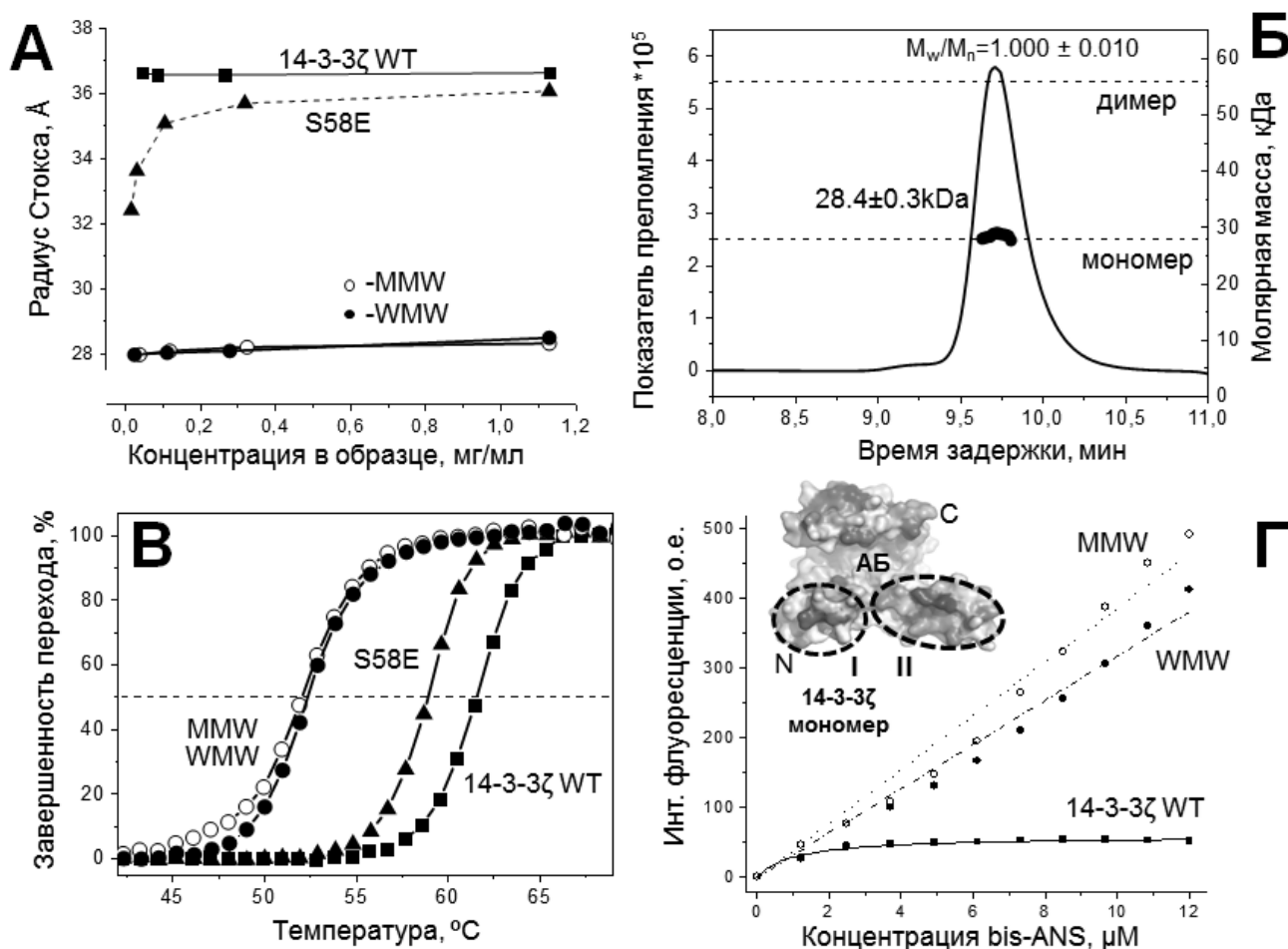


Рис. 26. А. Олигомерное строение 14-3-3 ζ WT и его мутантных форм WMW и MMW, в сравнении с ранее охарактеризованным белком S58E. Белки в концентрации от 0,01 до 1,15 мг/мл анализировали методом ГФ на колонке Superdex 200, калиброванной с помощью белков с известными радиусами Стокса. Б. Определение абсолютной молярной массы белка WMW (3 мг/мл) с помощью многоуглового лазерного светорассеяния. 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 14-3-3 ζ . В. Температурная зависимость триптофановой флуоресценции белков при нагревании с 10 до 80°C с постоянной скоростью 1°C/мин. Г. Титрование 14-3-3 (1 μ M) увеличивающимися концентрациями бис-АНС (0-12 μ M), регистрируемое по увеличению интенсивности флуоресценции при 495 нм (возбуждение при 385 нм). Кривые скорректированы на изменение флуоресценции свободного бис-АНС. Вставка показывает наличие в интерфейсе 14-3-3 ζ (код PDB 2C1J) двух гидрофобных кластеров, которые экспонируются при диссоциации димера.

3.2. Склонность N-концевой области 14-3-3 к структурной разупорядоченности

Учитывая, что диссоциация димеров 14-3-3 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.

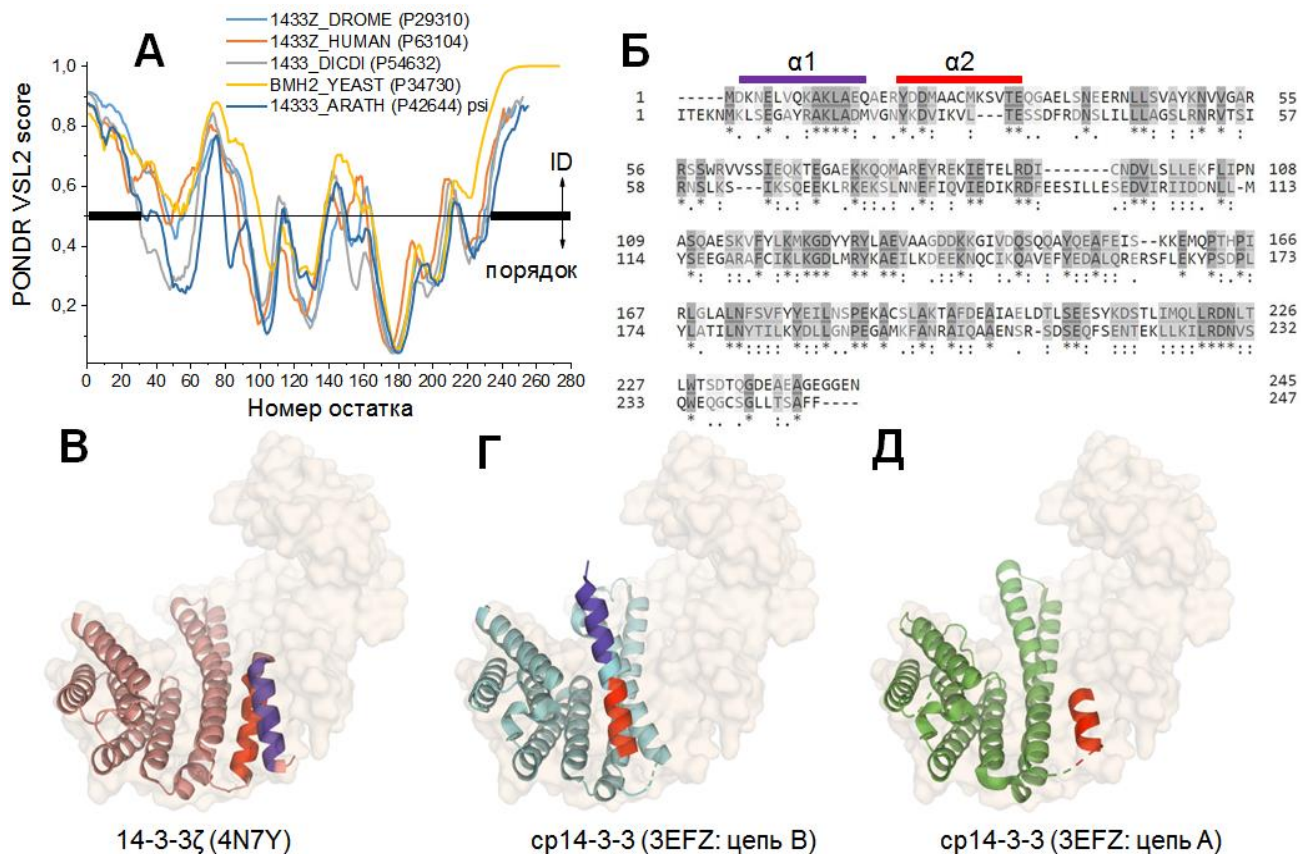


Рис. 27. Склонность N-концевого сегмента белков 14-3-3 к структурной разупорядоченности (ID). А. Склонность к ID (значения выше 0,5), рассчитанная с помощью алгоритма *PONDR VSL2* на основе последовательностей 14-3-3 из нескольких видов (указаны с идентификаторами *UniProt*). Сегменты с наибольшей склонностью к ID обозначены жирными линиями. Б. Выравнивание последовательностей 14-3-3 человека (*UniProt* P63104) и *Cryptosporidium parvum* (cp14-3-3, *UniProt* Q5CSF3), позволяющее картировать $\alpha 1$ и $\alpha 2$ спирали в структуре cp14-3-3. В-Д. Наложение кристаллических структур димера 14-3-3 человека (полупрозрачная поверхность) с двумя цепями cp14-3-3 (показаны зелеными и голубыми спиралями на панелях Д и Г, соответственно, в сравнении со структурой субъединицы 14-3-3 (В)). N-концевые спирали $\alpha 1$ (фиолетовый) и $\alpha 2$ (красный) соответствуют областям, идентифицированным по выравниванию на панели Б. N-концевой сегмент принимает различные конформации и образует либо две короткие α -спирали, либо одну длинную α -спираль, либо разупорядочен.

При анализе последовательностей в области димеризации (первые N-концевые спирали) мы обратили внимание на то, что практически все изученные белки 14-3-3 характеризуются выраженной склонностью к структурной разупорядоченности, которая сопоставима с таковой для гибкого С-концевого пептида (Рис. 27А). В составе большинства белков 14-3-3, структуры которых известны, эта N-концевая область (около 40 аминокислотных остатков) формирует короткие спирали $\alpha 1$ и $\alpha 2$, однако в редкой структуре 14-3-3 из *C. parvum* эта область представлена либо одной длинной α -спиралью, либо значительно разупорядочена (Рис. 27Б-Д).

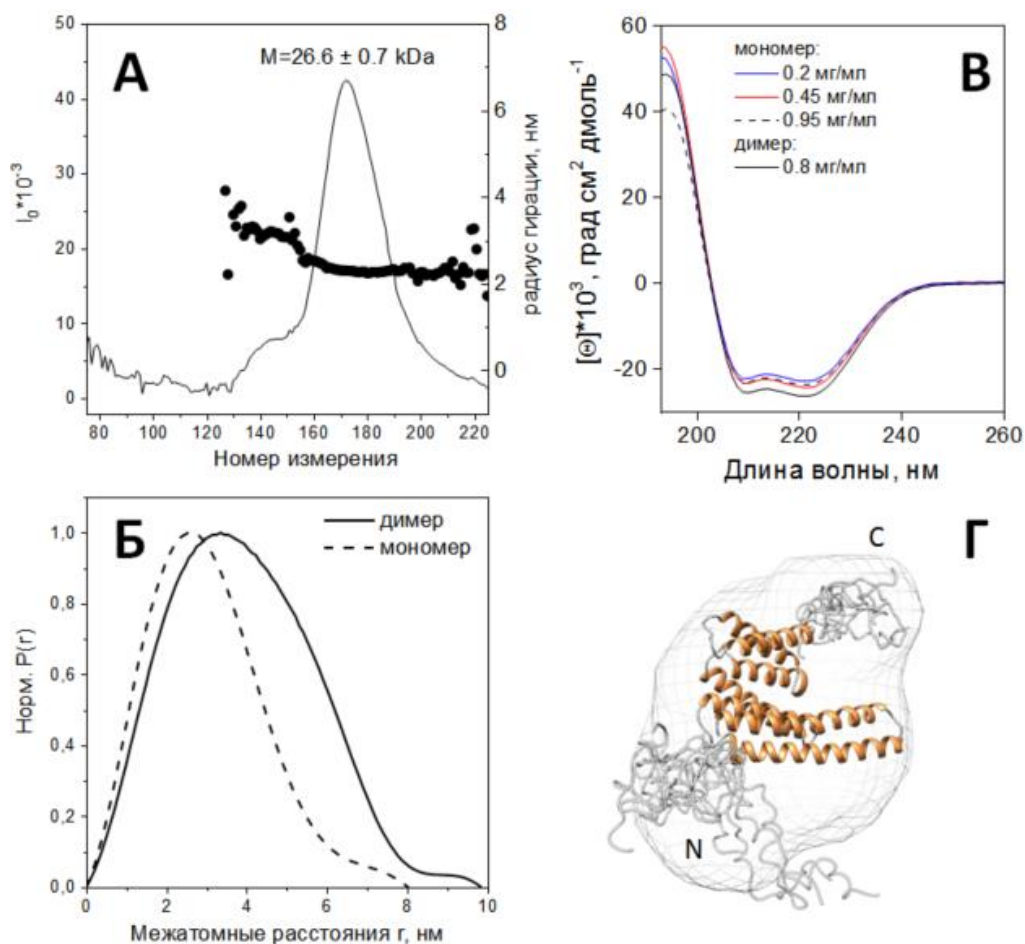


Рис. 28. Структура мономера 14-3-3 ζ в растворе. А. ГФ белка на колонке Shodex KW404-4F с многопараметрической детекцией, показывающая распределение R_g вдоль пика, а также молекулярную массу белка, усредненную по пику. Б. Распределение межатомных расстояний в димере и мономере 14-3-3 ζ . В. Спектр КД в дальнем УФ для мономера и димера 14-3-3 ζ при 25°C при указанных концентрациях (спектры скорректированы на концентрацию белка при расчете молярной эллиптичности). Г. Модель структуры мономера 14-3-3 ζ в растворе, полученная с помощью метода *EOM* (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* (10 прогонов) и *DAMAVER*.

Структура мономера 14-3-3 ζ в растворе была исследована с помощью метода МУРР при детекции непосредственно элюата с ГФ колонки (Рис. 28А). В качестве объекта был выбран наиболее стабильный мономерный вариант, несущий одновременно замены $^{12}\text{LAE}^{14} \rightarrow \text{AAA}$ и S58E , который мы смогли получить в концентрации 7,5 мг/мл, необходимой для анализа. На профиле был выявлен один монодисперсный пик, соответствующий мономеру белка, что позволило проанализировать структуру нужных частиц, исключив примесь димеров и агрегатов. Анализ данных МУРР, соответствующих пику мономера,

показал наличие сферообразных частиц с наличием выраженных гибких частей, выступающих за пределы сферы (максимальный диаметр 8 нм по сравнению с 10 нм для димера, Рис. 28Б). В сочетании с уменьшенной амплитудой спектров КД мономера при 222 нм, указывающих на ~15-20% уменьшение его α -спиральности (~40 остатков) по сравнению с белком дикого типа (Рис. 28В), данные МУРР подтвердили возможность структурного разупорядочивания N-концевой области 14-3-3 при мономеризации (Рис. 28Г).

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

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]. Однако механизм такой активности оставался загадочным: было наглядно показано, что ни АБ, ни гибкий С-концевой пептид не играют роли в шапероно-подобной активности 14-3-3 [23]. Сопоставив данные о том, что мономеры 14-3-3 обладают повышенной гидрофобностью и могут проявлять структурную разупорядоченность, скрытые в димерах, с тем, что именно эти атрибуты зачастую характерны для белков-шаперонов [24], мы предположили, что область интерфейса может участвовать в антиагрегационной активности 14-3-3.

Такая гипотеза была проверена при сравнении способности димеров и мономеров 14-3-3 ζ подавлять агрегацию нескольких модельных белков с разными механизмами агрегации. В условиях теплового шока (43°C), обе олигомерные формы 14-3-3 подавляли агрегацию субфрагмента 1 миозина (S1) в дозо-зависимом режиме, при этом мономерная форма была значительно эффективнее при всех выбранных соотношениях 14-3-3:S1 (Рис. 29А). Более того, антиагрегационная активность мономера 14-3-3 оказалась несколько выше или сопоставима с таковой у специализированного белка-шаперона – HSPB6 (Рис. 29Б). Важно, что в условиях эксперимента сами 14-3-3 не агрегировали, несмотря на повышенную температуру и продолжительное время инкубации.

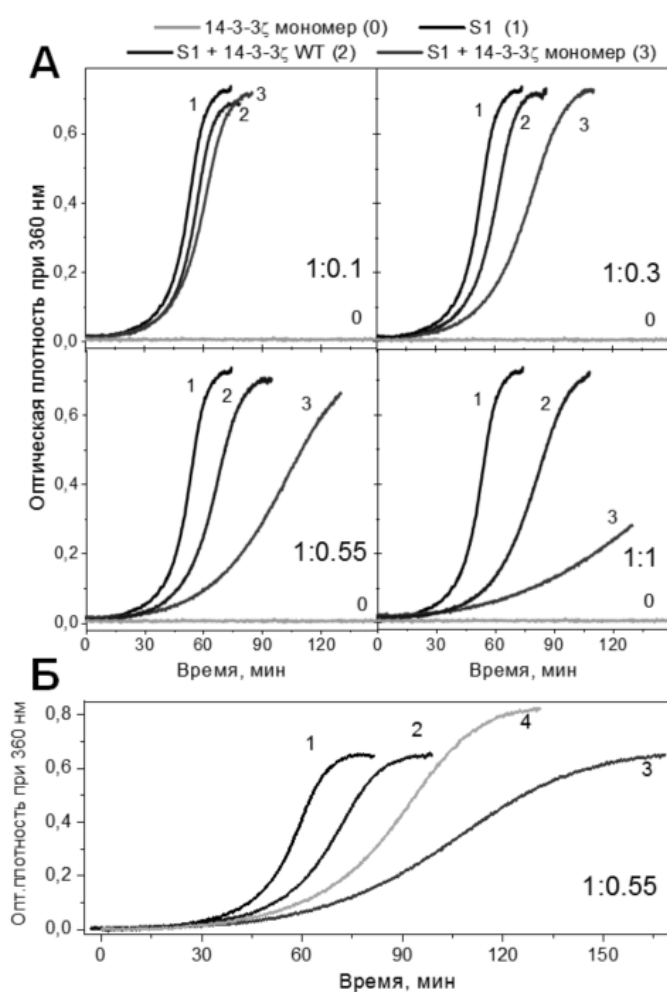


Рис. 29. А. Агрегация S1 миозина (0,46 мг/мл) в отсутствие (1) или в присутствии 14-3-3 ζ димера (2) или мономера (3) при 43°C при различных весовых соотношениях S1:14-3-3 (указаны на панелях). Кривая 0 показывает отсутствие агрегации шаперонов в условиях эксперимента. Б. Сравнение шапероно-подобной активности 14-3-3 ζ (2 – димер, 3 – мономер) и B6 (4) при весовом соотношении S1:шаперон равном 1:0,55. Кривая 1 – агрегация свободного S1.

Более высокая антиагрегационная активность мономера 14-3-3 была подтверждена при использовании металлофермента АДГ в качестве белка-субстрата, агрегация которого при 42°C провоцировалась внесением ЭДТА

(Рис. 30). В выбранных условиях димеры 14-3-3 были малоэффективны, в то время как мономеры 14-3-3 демонстрировали дозо-зависимый шапероно-подобный эффект, препятствуя агрегации и преципитации АДГ (Рис. 30). В результате, в присутствии мономеров 14-3-3 значительная доля АДГ в конце инкубации оставалась в растворимой фракции (Рис. 30Д). Более высокая антиагрегационная активность мономеров 14-3-3 была показана при использовании инсулина и киназы гликогенфосфорилазы в качестве субстратов агрегации, а при использовании лизоцима, и димеры и мономеры 14-3-3 оказывали неожиданное проагрегационное действие, демонстрируя некоторую избирательность шапероно-подобной активности (здесь не показано).

Таким образом, мы показали, что область интерфейса участвует в проявлении антиагрегационного действия 14-3-3 по отношению к нескольким белкам-субстратам. Ввиду антипараллельности димера 14-3-3 можно предполагать, что полная его диссоциация необязательна для проявления его

антиагрегационной активности, поскольку расхождение субъединиц с одной из сторон димера оказывается достаточным для экспонирования части интерфейса и проявления его свойств. Такой «шагающий» механизм (Рис. 31) может также лежать в основе обмена субъединицами при гетеродимеризации 14-3-3 без полной мономеризации.

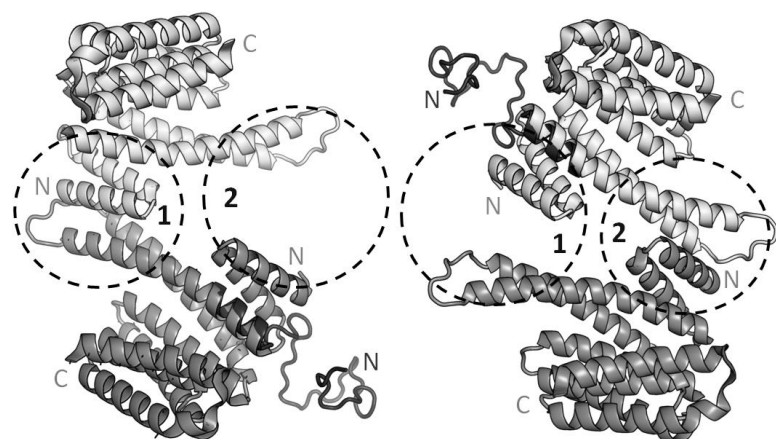
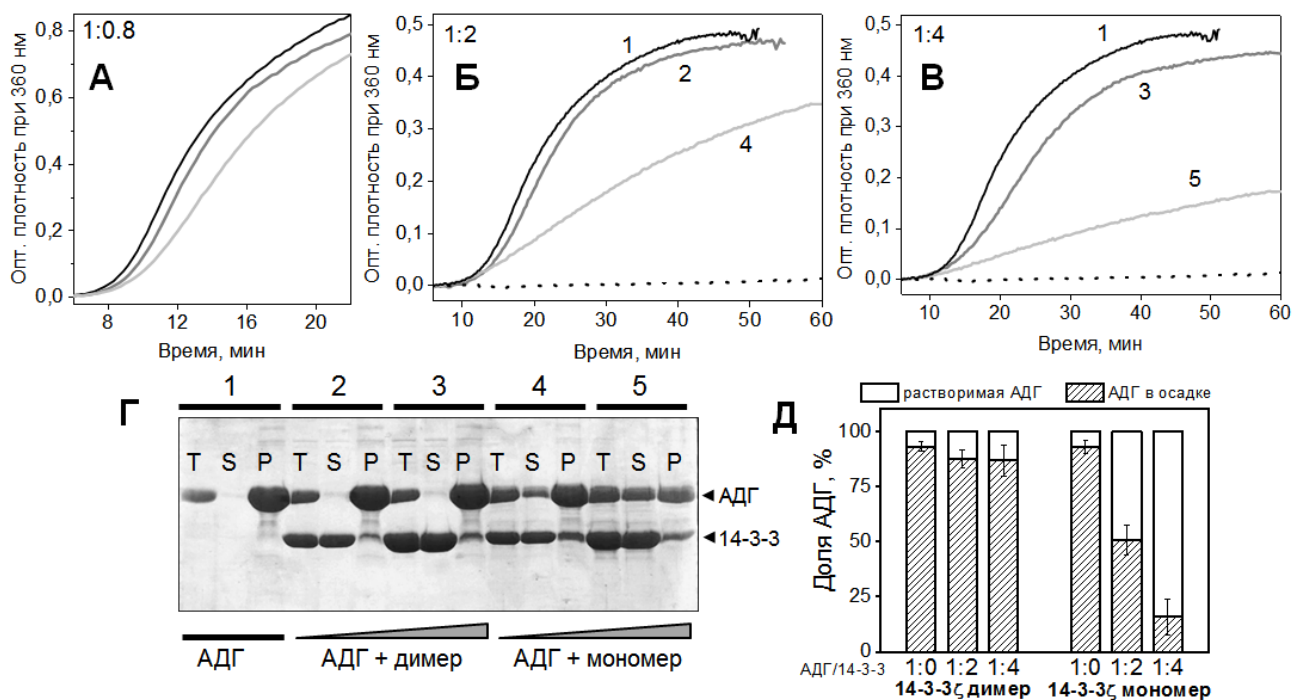


Рис. 31. Модель «шагающего» механизма, позволяющего димерам 14-3-3 осуществлять обмен субъединицами и проявлять антиагрегационную активность, раскрывая часть интерфейса, без полной мономеризации белка. Цифрами 1 и 2, а также штрихованными кружками отмечены две симметричных области, составляющие димерный интерфейс 14-3-3. Структурно разупорядоченная конформация N-концевого сегмента показана гибкой лентой.

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.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в международных рецензируемых журналах

1. **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. – Т. 50, № 45. – С. 9797-808.
2. **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. – Т. 51, № 31. – С. 6127-38.
3. **Sluchanko N. N.**, Gusev N. B. Oligomeric structure of 14-3-3 protein: what do we know about monomers? // *FEBS Lett*. – 2012. – Т. 586, № 24. – С. 4249-56.
4. **Sluchanko N. N.**, Chebotareva N. A., Gusev N. B. Modulation of 14-3-3/phosphotarget interaction by physiological concentrations of phosphate and glycerophosphates // *PLoS One*. – 2013. – Т. 8, № 8. – С. e72597.
5. **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. – Т. 549. – С. 32-9.
6. **Sluchanko N. N.**, Chebotareva N. A., Gusev N. B. Quaternary structure of human small heat shock protein HSPB6 (Hsp20) in crowded media modeled by trimethylamine N-oxide (TMAO): Effect of protein phosphorylation // *Biochimie*. – 2015. – Т. 108. – С. 68-75.
7. **Sluchanko N. N.**, Uversky V. N. Hidden disorder propensity of the N-terminal segment of universal adapter protein 14-3-3 is manifested in its monomeric form: Novel insights into protein dimerization and multifunctionality // *Biochim Biophys Acta*. – 2015. – Т. 1854, № 5. – С. 492-504.
8. **Sluchanko N. N.**, Tugaeva K. V., Faletrov Y. V., Levitsky D. I. High-yield soluble expression, purification and characterization of human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) fused to a cleavable Maltose-Binding Protein (MBP) // *Protein Expr Purif*. – 2016. – Т. 119. – С. 27-35.
9. **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. – Т. 25, № 2. – С. 305-316.
10. **Sluchanko N. N.**, Gusev N. B. Moonlighting chaperone-like activity of the universal regulatory 14-3-3 proteins // *FEBS J*. – 2017. – Т. 284, № 9. – С. 1279-1295.
11. **Sluchanko N. N.**, Tugaeva K. V., Greive S. J., Antson A. A. Chimeric 14-3-3 proteins for unraveling interactions with intrinsically disordered partners // *Sci Rep*. – 2017. – Т. 7, № 1. – С. 12014.

12. 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. – С. e0178933.
13. **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. – С. 20-26.
14. Chebotareva N. A., Eronina T. B., Roman S. G., Mikhaylova V. V., **Sluchanko N. N.**, Gusev N. B., Kurganov B. I. Oligomeric state of alphaB-crystallin under crowded conditions // Biochem Biophys Res Commun. – 2019. – T. 508, № 4. – С. 1101-1105.
15. **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. – С. 19-61.
16. Tugaeva K. V., Kalacheva D. I., Cooley R. B., Strelkov S. V., **Sluchanko N. N.** Concatenation of 14-3-3 with partner phosphoproteins as a tool to study their interaction // Sci Rep. – 2019. – T. 9, № 1. – С. 15007.
17. 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. – С. 747-759.
18. **Sluchanko N. N.** Reading the phosphorylation code: binding of the 14-3-3 protein to multivalent client phosphoproteins // Biochem J. – 2020. – T. 477, № 7. – С. 1219-1225.
19. 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. – T. 287, № 18. – С. 3944-3966.
20. Tugaeva K.V., Remeeva A., Gushchin I., Cooley R.B., **Sluchanko N.N.** Design, expression, purification and crystallization of human 14-3-3 ζ protein chimera with phosphopeptide from proapoptotic protein BAD // Protein Expr Purif. – 2020. – T. 175C, 105707.

Глава в книге

21. HspB6 (Hsp20) as a versatile molecular regulator. The big book on small heat shock proteins. / Sudnitsyna M. V., **Sluchanko N. N.**, Gusev N. B. – Switzerland: Springer, 2015. The big book on small heat shock proteins. - 603с.

Избранные тезисы докладов

1. **Н.Н. Случанко.** Регуляторные белок-белковые взаимодействия на примере белков семейства 14-3-3. VI молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии. Санкт-Петербург. 2018. *Пленарная лекция.*

2. **Н.Н. Случанко**, С. Белен, И.С. Черник, Н.А. Чеботарева, А.А. Куликова, С.Д. Уикс, М.В. Судницына, А.С. Сеит-Неби, А.А. Антсон, Н.Б. Гусев, С.В. Стрелков. VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды». Механизм взаимодействия малого белка теплового шока HSPB6 с белками семейства 14-3-3. Москва. 2017. *Приглашенный доклад*.
3. **Н.Н. Случанко**. Проблема олигомерного состояния универсальных адаптерных белков семейства 14-3-3. V Съезд биохимиков России. 2016. *Приглашенный доклад*.
4. K. Tugaeva, D. Kalacheva, **N. Sluchanko**. 14-3-3 protein chimera with its full-length phosphorylated partner protein HSPB6: design, solution structure and dynamic. FEBS Congress. Krakow, Poland. FEBS Open Bio 9 (Suppl.1) (2019) 65–431, p. 260.
5. K. Tugaeva, J. Titterington, A. Antson, **N. Sluchanko**. Structural basis for the interaction of 14-3-3 proteins with phosphopeptides of STARD1 revealed by the chimeric approach. FEBS Congress. Krakow, Poland. FEBS Open Bio 9 (Suppl.1) (2019) 65–431, p. 257.
6. **Н.Н. Случанко**, В.Н. Уверский. Скрытая склонность к разупорядоченности N-концевого сегмента универсального адаптерного белка 14-3-3 проявляется в его мономерной форме. VII Российский симпозиум «Белки и пептиды». Новосибирск. 2015.
7. **N. Sluchanko**, S. Roman, N. Chebotareva, N. Gusev. Chaperone-like activity of monomeric human 14-3-3 ζ on different protein substrates. FEBS/EMBO Congress. Paris, France. FEBS Journal 281 (Suppl. 1) (2014) 65–784. p. 242
8. **N.N. Sluchanko**, N.B. Gusev. Chaperone-like activity of the monomeric form of human 14-3-3Zeta protein. EMBO Conference. Sardinia, Italy. 2013. p. 99.
9. **Н.Н. Случанко**, М.В. Судницына, Н.Б. Гусев. Свойства мономерной формы универсального адаптерного белка 14-3-3. IV Съезд биофизиков России. Нижний Новгород. 2012. Симпозиум V, с. 31.
10. **N.N. Sluchanko**. Mutational approach for acquiring a model of the monomeric state of universal adaptor protein 14-3-3. Advanced FEBS Course “Sofia School of Protein Science: Structure and dynamics of biological macromolecules”. Sofia, Bulgaria. 2012, p. 31.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Obsil, T. and V. Obsilova, *Structural basis of 14-3-3 protein functions*. Semin Cell Dev Biol, 2011. **22**(7): p. 663-72.
2. Yano, M., et al., *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. **17**(11): p. 4769-79.
3. Stevers, L.M., et al., *Modulators of 14-3-3 Protein-Protein Interactions*. J Med Chem, 2018. **61**(9): p. 3755-3778.
4. Dreiza, C.M., et al., *The small heat shock protein, HSPB6, in muscle function and disease*. Cell Stress and Chaperones, 2009. **15**(1): p. 1-11.
5. Chernik, I., et al., *Small heat shock protein Hsp20 (HspB6) as a partner of 14-3-3gamma*. Mol Cell Biochem, 2007. **295**(1-2): p. 9-17.
6. Dreiza, C.M., et al., *Transducible heat shock protein 20 (HSP20) phosphopeptide alters cytoskeletal dynamics*. FASEB J, 2005. **19**(2): p. 261-3.
7. Mymrikov, E.V., A.S. Seit-Nebi, and N.B. Gusev, *Large potentials of small heat shock proteins*. Physiol Rev, 2011. **91**(4): p. 1123-59.
8. Lopes, L.B., et al., *Cell permeant peptide analogues of the small heat shock protein, HSP20, reduce TGF-beta1-induced CTGF expression in keloid fibroblasts*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(3): p. 590-8.
9. Goldschmidt, L., et al., *Toward rational protein crystallization: A Web server for the design of crystallizable protein variants*. Protein Sci, 2007. **16**(8): p. 1569-76.
10. Heirbaut, M., et al., *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. **292**(24): p. 9944-9957.
11. Bustos, D.M. and A.A. Iglesias, *Intrinsic disorder is a key characteristic in partners that bind 14-3-3 proteins*. Proteins, 2006. **63**(1): p. 35-42.
12. Avila, J., et al., *Tau in neurodegenerative diseases: tau phosphorylation and assembly*. Neurotox Res, 2004. **6**(6): p. 477-82.
13. Sluchanko, N.N. and N.B. Gusev, *Probable participation of 14-3-3 in tau protein oligomerization and aggregation*. J Alzheimers Dis, 2011. **27**(3): p. 467-76.
14. Sluchanko, N.N., A.S. Seit-Nebi, and N.B. Gusev, *Phosphorylation of more than one site is required for tight interaction of human tau protein with 14-3-3zeta*. FEBS Lett, 2009. **583**(17): p. 2739-42.
15. Amano, M., et al., *Identification of Tau and MAP2 as novel substrates of Rho-kinase and myosin phosphatase*. J Neurochem, 2003. **87**(3): p. 780-90.
16. Miller, W.L., *Mechanism of StAR's regulation of mitochondrial cholesterol import*. Mol Cell Endocrinol, 2007. **265-266**: p. 46-50.
17. Arakane, F., et al., *Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity*. J Biol Chem, 1997. **272**(51): p. 32656-62.
18. Gu, Y.-M., et al., *Protein kinase A phosphorylates and regulates dimerization of 14-3-3 epsilon*. FEBS Lett, 2006. **580**(1): p. 305-310.
19. Boon, S.S. and L. Banks, *High-risk human papillomavirus E6 oncoproteins interact with 14-3-3zeta in a PDZ binding motif-dependent manner*. J Virol, 2013. **87**(3): p. 1586-95.
20. Kaplan, A., et al., *Polypharmacological Perturbation of the 14-3-3 Adaptor Protein Interactome Stimulates Neurite Outgrowth*. Cell Chem Biol, 2020. **27**(6): p. 657-667 e6.
21. Han, D., et al., *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. **396**(2): p. 401-406.
22. Sluchanko, N.N., et al., *Effect of mutations mimicking phosphorylation on the structure and properties of human 14-3-3zeta*. Arch Biochem Biophys, 2008. **477**(2): p. 305-12.
23. Williams, D.M., et al., *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. **437**(3): p. 493-503.
24. Holt, C., J.K. Raynes, and J.A. Carver, *Sequence characteristics responsible for protein-protein interactions in the intrinsically disordered regions of caseins, amelogenins, and small heat-shock proteins*. Biopolymers, 2019. **110**(9): p. e23319.