

На правах рукописи



Шатов Владислав Михайлович

**N-концевой домен малых белков теплового шока:
участие в олигомеризации и белок-белковых
взаимодействиях**

1.5.4. Биохимия

Автореферат диссертации

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва 2023

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

Научный руководитель: член-корр. РАН, д.б.н., профессор

Гусев Николай Борисович

Официальные оппоненты:

Гривенников Игорь Анатольевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

Хайтлина София Юрьевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Института цитологии РАН

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН»

Защита состоится «___» _____ 2024 г. в ___ часов на заседании Диссертационного совета 24.1.233.01 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 официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <http://www.fbras.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Орловский А. Ф.

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Малые белки теплового шока (sHsp) - широко распространенная группа АТР-независимых шаперонов. sHsp принимают активное участие в таких процессах клеточного протеостаза, как стабилизация клеточного цитоскелета, регуляция сократительной активности мышц, апоптоз, поддержание RedOx статуса клетки и многих других процессах [1]. sHsp экранируют гидрофобные участки на поверхности денатурированных белков, предотвращая их агрегацию. Эта так называемая холдазная (holdase) активность (по-другому, шапероноподобная активность) особенно важна в клетке в условиях сильного стресса, когда множество белков одновременно теряют нативную структуру и могут массово агрегировать. Связывание субстратов в неправильной конформации малыми белками теплового шока позволяет предотвратить перегрузку системы АТР-зависимого рефолдинга белка и избежать пагубных последствий для жизнедеятельности клетки [2]. Мутации в генах sHsp часто коррелируют с развитием таких наследственных заболеваний, как болезнь Шарко-Мари-Тута 2 типа, дистальная врожденная невропатия, катаракта, а также с различными видами кардиомиопатий [3].

В геноме человека обнаружены 10 генов, кодирующих белки этого семейства. Для всех sHsp свойственна небольшая молекулярная масса мономеров (17-23 кДа) и первичная структура, состоящая из трех частей. В центральной области sHsp, расположен консервативный α -кристаллиновый домен (ACD), обычно состоящий из 90-100 аминокислотных остатков. С N- и C-концов этот домен фланкирован мало консервативными последовательностями, так называемыми N-концевым (NTD) и C-концевым (CTD) доменами, чья длина и структура могут сильно отличаться у разных представителей этого семейства [1].

Отличительной особенностью sHsp является их способность к олигомеризации и формированию сложноорганизованных мультисубъединичных комплексов, включающих до 40 субъединиц. Считается, что сложная четвертичная структура формируется за счет нескольких типов взаимодействий. На первом этапе происходит взаимодействие между антипараллельно ориентированными β 7 складками α -кристаллиновых доменов двух мономеров. Далее, при наличии IxI-мотива в C-концевом участке, димеры могут объединяться в тетрамеры/гексамеры за счет взаимодействия IxI последовательности одного мономера с β 4/ β 8 канавкой α -кристаллинового домена соседнего мономера. Некоторые малые белки теплового шока способны формировать еще более крупные комплексы за счет взаимодействия их N-концевых участков [4]. Кроме того, подвижные

Список сокращений: ДТТ – дитиотреитол, ACD – α -кристаллиновый домен, bis-ANS - 4,4'-дианилино-1,1'-бинафтил-5,5'-дисульфоновая кислота, CTD – C-концевой домен, IPTG - изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид, NTD – N-концевой домен, PMSF - фенилметилсульфонил фторид, sHsp – малый белок теплового шока, SEC-MALS – аналитическая гель-фильтрация, сопряженная с детектором многоугольного рассеяния света, TMAO – триметиламиноксид.

N-концевые домены также необходимы для формирования гетероолигомерных комплексов, обеспечивая взаимодействие между субъединицами ортологичных белков.

Детальное понимание механизмов участия N-концевого домена в процессе построения четвертичной структуры sHsp остается еще недостаточно изученным во многом из-за высокой подвижности и внутренне разупорядоченной структуры этого участка. Мутации в N-концевом домене сопряжены с развитием тяжелых наследственных заболеваний и многие из таких «горячих точек» в белке располагаются около или непосредственно в составе полуконсервативной последовательности, обозначаемой как sRLFDQxFG мотив, в начале N-концевого домена многих sHsp. Все это делало целесообразным подробное изучение структуры и свойств N-концевых доменов различных малых белков теплового шока.

Таким образом, **целью диссертационного исследования** был анализ влияния делеций и точечных аминокислотных замен в N-концевом домене некоторых sHsp человека на их структуру и физико-химические свойства, процессы гомо- и гетероолигомеризации, а также взаимодействия с белками-партнерами.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить в гомогенном виде препараты полноразмерных HspB1, HspB5, HspB6, HspB7, HspB8, их α -кристаллиновые домены, а также белки, содержащие делеции и точечные аминокислотные замены в N-концевом домене;
2. Исследовать олигомерную структуру α -кристаллиновых доменов пяти малых белков теплового шока HspB1, HspB5, HspB6, HspB7, HspB8;
3. Проанализировать процесс включения изолированных α -кристаллиновых доменов в структуру олигомеров, образованных полноразмерными sHsp;
4. Исследовать влияние делеций и точечных аминокислотных замен в N-концевом домене на процессы гомо- и гетероолигомеризации;
5. Изучить влияние точечных замен S10F и P20L, ассоциированных с развитием кардиомиопатии, на физико-химические свойства HspB6;
6. Изучить роль N-концевых доменов в формировании олигомерной структуры HspB7 и HspB8.

Основные положения, выносимые на защиту

1. α -кристаллиновые домены HspB1, HspB5, HspB6 в растворе представлены в виде равновесной смеси димеров и мономеров, а α -кристаллиновые домены HspB7 и HspB8 преимущественно представлены в виде мономеров;
2. Фосфоимитирующие аминокислотные замены в N-концевом домене HspB1 дестабилизируют крупные олигомеры и повышают вероятность включения новых субъединиц в состав гетероолигомера;
3. Делеция консервативной последовательности SRLFD в составе N-концевого домена или замена аргинина на аланин в составе консервативного мотива

дестабилизируют крупные гомоолигомеры HspB1 и HspB5 и увеличивают вероятность образования гетероолигомеров с HspB6. Аналогичная делеция или замена аргинина в N-концевом домене HspB6 затрудняют образование его гетероолигомеров с HspB1 и HspB5;

4. Точечные аминокислотные замены S10F и P20L в N-концевом домене HspB6, коррелирующие с развитием кардиомиопатии, приводят к увеличению гидрофобности и усилению процесса самоассоциации в условиях краудинга;
5. Делеция N-концевого домена или некоторых его участков влияет на процессы ассоциации и агрегации HspB7;
6. Из-за особенностей первичной структуры α -кристаллинового домена полноразмерный HspB8 в растворе представлен в виде мономеров, что отличает его от большинства других малых белков теплового шока.

Научная новизна и практическая ценность работы

Проведен детальный анализ роли различных участков N-концевого домена в формировании четвертичной структуры гомо- и гетероолигомеров разных малых белков теплового шока человека. Исследована олигомерная структура α -кристаллиновых доменов HspB1, HspB5, HspB6, HspB7 и HspB8. В отличие от принятого в литературе мнения о стабильности структуры димеров α -кристаллиновых доменов, установлено, что α -кристаллиновые домены HspB1, HspB5 и HspB6 представлены в виде равновесной смеси мономеров и димеров, а α -кристаллиновые домены HspB7 и HspB8 преимущественно представлены в виде мономеров. Выявлена роль консервативного sRLFDQxFG мотива N-концевого домена в процессах гетероолигомеризации между HspB1, HspB5 и HspB6. Установлено, что аминокислотные замены S10F и P20L в N-концевом домене HspB6, коррелирующие с развитием кардиомиопатии, влияют на физико-химические свойства и шапероноподобную активность белка. Разработана методика выделения рекомбинантного HspB7 человека и установлено, что N-концевой домен играет важную роль в ассоциации и агрегации этого белка. Определено, что в отличие от большинства малых белков теплового шока, HspB8 представлен в растворе в виде мономера.

Методология и методы диссертационного исследования. Работа проведена с использованием современных биохимических, биофизических и молекулярно-биологических методов.

Степень достоверности полученных результатов. Постановка цели и задач работы, подготовка обзора литературы и обсуждение основаны на анализе актуальных публикаций по теме исследования. Достоверность результатов, полученных в ходе работы, подтверждается воспроизводимостью измерений, согласованностью результатов, полученных с использованием различных современных физико-химических методов исследования белков.

Апробация результатов работы была проведена на заседании кафедры биохимии биологического факультета МГУ, межлабораторном семинаре ФИЦ Биотехнологии РАН, а также на межлабораторном семинаре sHSP WOG Meeting в 2019 г. (Лёвен, Бельгия) и на 46-м Международном Конгрессе FEBS в 2022 г. (Лиссабон, Португалия).

Публикации. По теме диссертации было опубликовано 8 печатных работ в профильных журналах и 2 тезиса сообщений на конференциях.

Личный вклад соискателя присутствует на всех этапах работы, начиная от отработки используемых методик и завершая получением экспериментальных данных, их обработки, обсуждения результатов, подготовки статей и тезисов конференций.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена по стандартному плану и включает в себя введение, обзор литературы, описание используемых материалов и методов, изложение полученных результатов и их обсуждение, выводы, приложение и список используемой литературы. Работа изложена на 111 страницах машинописного текста, содержит 39 рисунков, 4 таблицы и 180 библиографических ссылок.

Содержание работы

Обзор литературы

В обзоре литературы представлены данные о структуре и функциях малых белков теплового шока человека, а также о роли N-концевого домена в формировании олигомерных комплексов sHsp. Особое внимание уделено описанию процесса гетероолигомеризации малых белков теплового шока и их взаимодействия с белками-партнерами.

Материалы и методы исследования

Получение препаратов используемых белков. Препараты рекомбинантных sHsp дикого типа, их мутантные формы и α -кристаллиновые домены получали в бактериальной системе экспрессии. Векторы pET22b, содержащие последовательности HspB1R27A, HspB5R22A, HspB5 Δ 21-25, HspB6R27A, HspB6 Δ 26-30, HspB6S10F и HspB6P20L были получены в компании «Евроген». Кодировующие последовательности α -кристаллиновых доменов и мутантных форм HspB1 Δ 26-30, HspB7 Δ 13 (удалены 1-13 остатки), HspB7 Δ Ser (удалены 17-29 остатки) были получены методом ПЦР на основе кДНК белков дикого типа и клонированы в вектор pET23a(+). Экспрессию белков проводили в клетках штаммов *E. coli* BL21(DE3)pLysS или Rosetta2(DE3)pLysS методами автоиндукции или путем добавления индуктора IPTG. Очистку белков проводили по стандартной методике, разработанной в нашей лаборатории [5]. Выделение и очистку рекомбинантного HspB7 дикого типа и его мутантных форм проводили по оригинальной методике, включающей в себя стадии

осаждения белка сульфатом аммония, гидрофобную хроматографию на фенол-сефарозе и препаративную гель-фильтрацию [6].

Анализ четвертичной структуры. Исследование четвертичной структуры α -кристаллиновых доменов проводили методом аналитической гель-фильтрации. На колонку Superdex 75, уравновешенную буфером В (50 мМ фосфатного буфера pH 7.4, 150 мМ NaCl, 2 мМ ДТТ, 0.1 мМ PMSF), наносили пробы, содержащие разные количества белка, и анализировали зависимость объема элюции от количества белка [7].

При определении молекулярной массы белка в пике методом SEC-MALS на колонку Superdex 200 Increase HR 10/30, уравновешенную буфером S (20 мМ Трис-HCl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 3 мМ ДТТ, 0.1 мМ PMSF), наносили 180 мкг α -кристаллиновых доменов или 240 мкг HspB8. Количество белка в пиках элюции оценивали по поглощению при 280 нм, многоугловое рассеяние измеряли при помощи детектора miniDAWN (Wyatt Technology, USA), принимая dn/dc равным 0.185 [7]. Автор благодарен д.б.н. Н.Н. Случанко за помощь в проведении SEC-MALS экспериментов.

Эффект краудинга на четвертичную структуру HspB6 и его точечных мутантов оценивали с помощью гель-фильтрации. На колонку Superdex 200 Increase HR 10/30, уравновешенную буфером S, содержащем 0,5 М ТМАО и 15 мМ β -меркаптоэтанола вместо ДТТ, наносили 250 мкг HspB6 дикого типа или его точечных мутантов [8].

Формирование гетероолигомерных комплексов. Формирование гетерокомплексов между малыми белками теплового шока дикого типа и их мутантными формами или sHsp и α -кристаллиновыми доменами проводили, инкубируя смесь исследуемых белков в молярном соотношении 1:1 при 42°C в течение 30 мин. Контрольные образцы инкубировали параллельно при 4 °C (условия, при которых обмен субъединицами заторможен). Смесь наносили на колонку Superdex 200 Increase HR 10/30, полученные фракции осаждали трихлоруксусной кислотой и анализировали белковый состав проб методом электрофореза в денатурирующих условиях [9].

Спектроскопические исследования. Измерения гидрофобных свойств HspB6 и его мутантных форм с заменами S10F и P20L проводили в буфере F (20 мМ HEPES/NaOH pH 7.5, 100 мМ NaCl, 2 мМ ДТТ), титруя исследуемые белки гидрофобным зондом bis-ANS [10]. Метод светорассеяния использовали для анализа термической стабильности. Все измерения проводили в буфере F при нагревании со скоростью 1 °C/мин в диапазоне 20-85 °C. Образец освещали светом с длиной волны 340 нм и регистрировали рассеяние при 340 нм. Все опыты по измерению флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse [10].

Основные результаты и их обсуждение

Формирование четвертичной структуры малых белков теплового шока происходит при участии всех трех доменов их первичной структуры (ACD, NTD и CTD) (рис. 1 А) [4].

Однако, детальное изучение принципов олигомеризации и выявление конкретных участков sHsp, ответственных за взаимодействие между субъединицами, оказывается достаточно затруднительным. Для уточнения деталей взаимодействия между субъединицами sHsp мы предложили использовать несколько экспериментальных подходов, с помощью которых стало возможно более подробно изучать процессы присоединения и включения субъединиц в олигомеры. В первой части работы нами были получены гомогенные препараты белков HspB1, HspB5, HspB6, HspB8 дикого типа, α -кристаллиновые домены B1ACD₈₄₋₁₇₀, B5ACD₆₄₋₁₅₀, B6ACD₆₄₋₁₄₉, B7ACD₇₁₋₁₅₄, B8ACD₈₅₋₁₇₁ и мутантные формы: HspB1R27A, HspB1 Δ 26-30, HspB5R22A, HspB5 Δ 21-25, HspB6R27A, HspB6 Δ 26-30, HspB6S10F, HspB6P20L, а также белки-партнеры 14-3-3 и BAG3. Для получения рекомбинантного полноразмерного HspB7 человека и мутантных форм HspB7 Δ 13 и HspB7 Δ Ser нами была разработана оригинальная методика экспрессии и выделения этого белка из растворимой фракции клеточных белков. Во второй и третьей частях работы мы исследовали олигомерное состояние ACD и взаимодействие между изолированными ACD, лишенными N- и C-концевых последовательностей, и крупными олигомерами, образованными полноразмерными sHsp. В четвертой и пятой частях работы мы анализировали влияние мутаций и делеций в N-концевом домене малых белков теплового шока на их физико-химические свойства и их способность образовывать гетероолигомеры. Наконец, в шестой части работы мы изучали структуру и свойства ранее недостаточно исследованных HspB7 и HspB8 и анализировали роль N-концевого домена в формировании олигомерной структуры этих белков.

Анализ олигомерного состояния α -кристаллиновых доменов различных малых белков теплового шока человека

ACD является наиболее консервативным участком в структуре sHsp и формирует укладку иммуноглобулин-подобного домена. Структурные исследования показали, что мономеры малых белков теплового шока взаимодействуют друг с другом антипараллельно ориентированными β 7 складками α -кристаллиновых доменов [11, 12]. Наибольший объем структурных данных был получен только для ACD «классических» шаперонов HspB1, HspB5 и HspB6, в то время как детальное строение ACD других представителей этого семейства (таких как HspB7 и HspB8) изучено значительно хуже.

На первом этапе работы были получены гомогенные препараты ACD пяти малых белков теплового шока (B1ACD, B5ACD, B6ACD, B7ACD и B8ACD) (рис. 1 А) и методом гель-фильтрации изучена их олигомерная структура. Все ACD элюировались с колонки в виде симметричных пиков, положение которых зависело от природы анализируемых пептидов (рис. 1 Б). При нанесении на колонку одинаковых количеств белка (130 мкг) объем элюции B1ACD составлял 11.5 мл, в то время как объемы элюции B7ACD составлял 13.2 мл (рис. 1 Б). Более того, оказалось, что объем элюции B1ACD, B5ACD и B6ACD существенно зависел от количества белка, нанесенного на колонку, в то время как объемы элюции B7ACD и B8ACD не зависели от количества белка, нанесенного на колонку (данные не

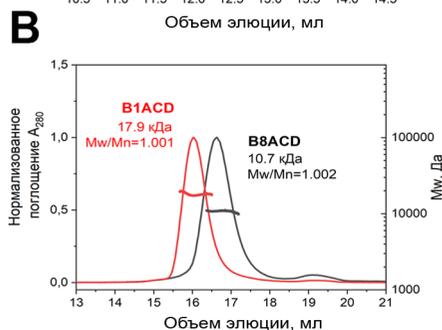
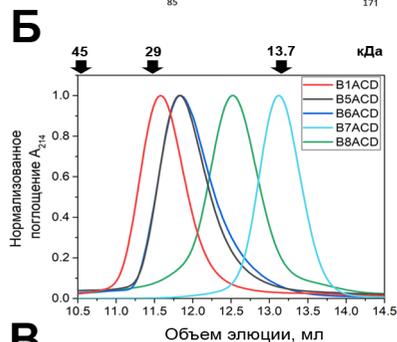
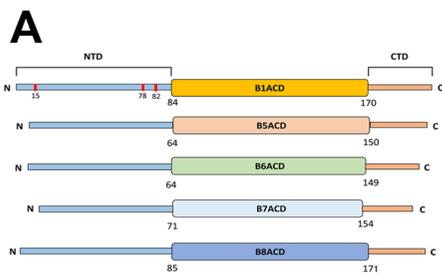


Рис. 1. **А.** Схема строения пяти малых белков теплового шока человека. NTD – N-концевой домен, ACD – α -кристаллиновый домен, CTD – C-концевой домен. Границы ACD указаны цифрами. Красные линии и номера указывают положения замен в 3D мутанте, использованном в работе. **Б.** Аналитическая гель-фильтрация пяти ACD. Молекулярные массы белков стандартов указаны над стрелками. На колонку наносили по 130 мкг белка. **В.** Определение абсолютных молекулярных масс методом аналитической гель-фильтрации, сопряженной с детектором MALS. На колонку наносили по 180 мкг белка. Полученная молекулярная масса и индекс полидисперсности указаны рядом с пиками элюции.

представлены). Изменение положения максимумов элюции при изменении концентрации белка может указывать на то, что B1ACD, B5ACD и B6ACD образуют олигомеры, которые диссоциируют при разведении. Для уточнения олигомерного состояния анализируемых ACD, был использован метод SEC-MALS. Этот подход применим только для ACD, обладающих достаточно высоким коэффициентом экстинкции. Такими свойствами в нашем случае обладали изолированные B1ACD и B8ACD. Усредненные молекулярные массы B1ACD и B8ACD составили соответственно 17.9 и 10.7 кДа (рис. 1 В). Принимая во внимание расчетную молекулярную массу мономеров изолированных ACD, можно предположить, что в растворе B1ACD представлен в виде устойчивого димера, а B8ACD - в виде мономера. Объемы элюции B5ACD и B6ACD близки объемам элюции B1ACD и положение пика элюции этих доменов также зависит от количества белка, нанесенного на колонку. Поэтому можно предположить, что B5ACD и B6ACD в растворе также представлены в виде равновесной смеси мономеров и димеров. Анализируя зависимость объема элюции от количества белка, нанесенного на колонку, мы установили, что прочность интерфейса димеризации убывает в ряду B1ACD >> B5ACD > B6ACD. Так как объемы элюции B7ACD и B8ACD не зависят от количества белка, нанесенного на колонку, а измеренная молекулярная масса B8ACD близка к расчетной массе мономера, можно заключить, что эти домены представлены в виде мономеров. Далее мы постарались определить причины, по которым B7ACD и B8ACD не формируют димеров в исследуемом диапазоне концентраций.

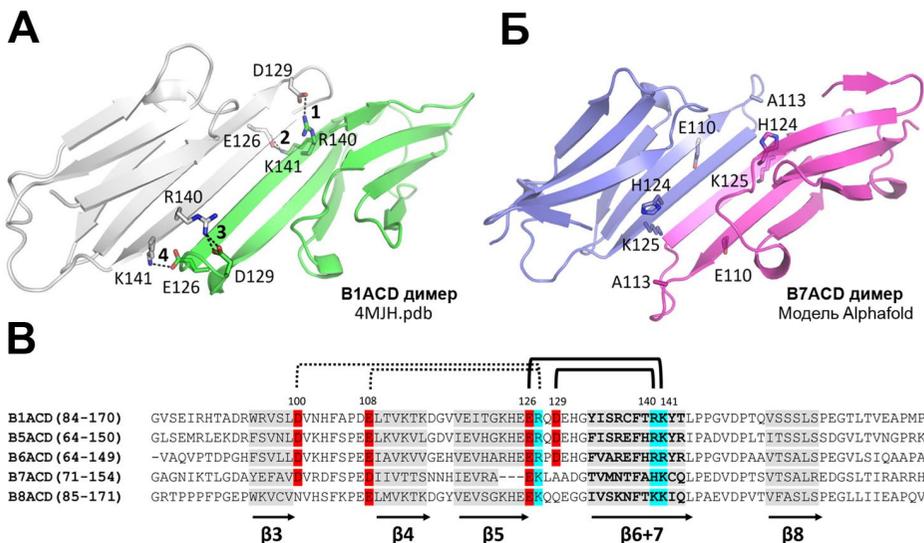


Рис. 2. Структурные особенности строения интерфейсов димеризации разных sHsp. Приведено сравнение структур α -кристаллиновых доменов B1ACD (A) и B7ACD (Б), показано наличие четырех солевых мостов (отмечены номерами на панели A) в структуре B1ACD и отсутствие солевых контактов в структуре B7ACD. В. Множественное выравнивание α -кристаллиновых доменов пяти sHsp человека. Границы α -кристаллиновых доменов указаны в скобках. Положение β -складок выделено тёмно-серым цветом и отмечено стрелками. Остатки аминокислот, принимающих участие в образовании солевых контактов, указаны номерами, соответствующим позициям в структуре полноразмерного HspB1, и выделены цветом. Положительно заряженные остатки аминокислот выделены голубым, а отрицательно заряженные – красным цветом. Солевые мостики между мономерами указаны черными скобками.

Для объяснения столь различного поведения α -кристаллиновых доменов гомологичных между собой малых белков теплового шока мы провели подробный анализ их первичной и четвертичной структуры. Используя доступные кристаллические структуры B1ACD, B5ACD и B6ACD [12, 13], а также моделируя с помощью AlphaFold2 отсутствующие в открытом доступе структуры B7ACD и B8ACD, нам удалось показать, что в структурах B1ACD, B5ACD и B6ACD сформирован канонический интерфейс димеризации, стабилизированный водородными связями и солевыми мостиками. В тоже время в структурах B7ACD и B8ACD некоторые из контактов, критичные для стабилизации димера, отсутствуют. Так, например, канонический интерфейс димеризации B1ACD сформирован за счет 10 водородных связей между группами CO и NH в антипараллельно ориентированных $\beta 7$ складках соседних мономеров и дополнительно стабилизирован за счет 4-х пар солевых мостов между остатками Arg140-Asp129 и Lys141-Glu126 (рис. 2 A, B) [12]. Аналогичные межмолекулярные контакты были обнаружены в кристаллических структурах димеров B5ACD и B6ACD [14]. Выравнивание первичных структур B7ACD и B8ACD показывает, что в гомологичных положениях у этих белков находятся аминокислотные остатки, не способные завязывать ионные связи. Так консервативный Arg140 заменен на His у B7ACD или Lys у B8ACD, Asp129 замещен Ala у B7ACD или Gln у B8ACD (рис. 2 B). В дополнение к этому стоит отметить, что при моделировании структур димеров B7ACD с помощью

программы AlphaFold2 были получены варианты структур, содержащие как канонический $\beta 7/\beta 7$ интерфейс, скрепленный более короткими β -складкам (рис. 2 Б), так и неканонический $\beta 4/\beta 8$ интерфейс, что говорит об общей неустойчивости структуры димера. Таким образом, замены аминокислот на ключевых позициях в первичных структурах В7АСD и В8АСD приводят к неспособности этих АСD формировать устойчивую димерную структуру.

Полученные результаты позволили более полно охарактеризовать строение АСD разных малых белков теплового шока и перейти к изучению взаимодействия изолированных α -кристаллиновых доменов с полноразмерными малыми белками теплового шока.

Встраивание изолированных α -кристаллиновых доменов в состав олигомеров полноразмерных малых белков теплового шока

Изолированные α -кристаллиновые домены являются удобным объектом для исследования встраивания субъединиц в комплексы малых белков теплового шока тем, что отсутствие у них N- и C- концевых участков значительно упрощает интерпретацию результатов в такой модели. Известно, что малые белки теплового шока HspB1, HspB5 и HspB6 часто совместно экспрессируются в некоторых органах и тканях и могут формировать гетероолигомерные комплексы [15]. При этом, если HspB1 и HspB5 образуют крупные гомоолигомеры, то HspB6 в растворе формирует только небольшие олигомеры. В нашей работе мы анализировали, каким образом происходит процесс включения АСD HspB1, HspB5 и HspB6 в состав олигомеров, образованных полноразмерными малыми белками теплового шока.

Взаимодействие полноразмерных HspB1 и HspB5 с разными АСD можно анализировать методом гель-фильтрации, так как молекулярные массы олигомеров HspB1 и HspB5 сильно отличаются от молекулярной массы исследуемых АСD. Инкубация В1АСD, В5АСD и В6АСD с полноразмерными HspB1 или HspB5 не сопровождалась включением АСD в состав крупных комплексов, но приводила к небольшому смещению пика, соответствующего крупным олигомерам полноразмерных белков, в сторону большего объема элюции и к его незначительному уширению (данные не приведены). В отсутствие N- и C-концевых последовательностей α -кристаллиновые домены не способны закрепиться в составе крупных олигомерных комплексов, образованных полноразмерными HspB1 и HspB5. Вероятнее всего они лишь слабо (транзиентно) взаимодействуют с крупными мультимерами и слабо конкурируют с полноразмерными субъединицами за включение в олигомерный комплекс. Это приводит к незначительным изменениям в профиле элюции крупных олигомерных комплексов при гель-фильтрации. В лаборатории Клевит (Klevit) был предложен механизм, описывающий встраивание HspB6 в крупные комплексы, образованные HspB5 [16]. Было постулировано, что в начале процесса HspB6 связывается своей гидрофобной канавкой, образованной $\beta 4/\beta 8$ складками, с IxI-мотивом HspB5, расположенным в его C-концевом домене [16].

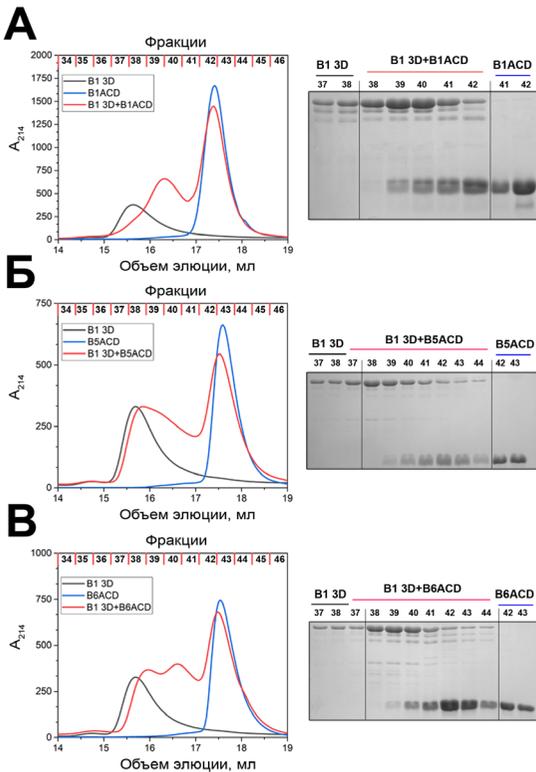


Рис. 4. Взаимодействие B1ACD (А), B5ACD (Б) и B6ACD (В) с 3D мутантом HspB1. На хроматограммах указаны профили элюции HspB1 3D (черная линия), ACD (синяя линия) и их эквимольные смеси (красная линия). Электрофореграммы с анализом белкового состава фракций представлены справа от каждой из хроматограмм.

линовых доменов с так называемым 3D мутантом HspB1 (HspB1 3D), в котором три указанных остатка серина заменены на остатки аспарагиновой кислоты. Смеси HspB1 3D с B1ACD, B5ACD или B6ACD инкубировали и подвергали гель-фильтрации. Белковый состав полученных в ходе хроматографии фракций анализировали методом денатурирующего электрофореза (рис. 4). Оказалось, что все анализируемые α -кристаллиновые домены (B1ACD, B5ACD и B6ACD) эффективно взаимодействуют и встраиваются в четвертичную структуру малых олигомеров, образованных HspB1 3D (рис. 4).

Представленные данные свидетельствуют о том, что в крупных олигомерах N-концевой домен играет важную роль в стабилизации четвертичной структуры и

Полученные нами данные согласуются с предложенной моделью и позволяют выдвинуть предположение, что ACD улавливаются C-концевыми доменами мономеров, входящих в состав крупных олигомеров. Однако отсутствие NTD делает невозможным прочное встраивание изолированных α -кристаллиновых доменов в состав крупного олигомера.

Причиной малой эффективности встраивания изолированных ACD в состав крупных олигомеров может быть прочное взаимодействие между полноразмерными субъединицами в составе крупного олигомера за счет N-концевых доменов. Фосфорилирование остатков Ser15, Ser78 и Ser82 в N-концевом домене HspB1 сопровождается дестабилизацией крупного олигомера и его диссоциацией до малых олигомеров, представленных димерами или тетрамерами [17]. Мы проанализировали взаимодействие α -кристал-

ограничивает включение новых субъединиц (α -кристаллиновых доменов) в состав олигомера. Фосфорилирование или мутации, имитирующие фосфорилирование, ослабляют взаимодействие между N-концевыми доменами, что дестабилизирует крупные олигомеры и в конечном счете способствует встраиванию ACD в их состав.

Мы также анализировали возможность взаимодействия B7ACD и B8ACD с полноразмерными HspB1, HspB5 и HspB1 3D. Методом аналитической гель-фильтрации и электрофореза в нативных условиях нам не удалось детектировать формирование гетерокомплексов, что может быть связано с тем, что указанные α -кристаллиновые домены либо слабо взаимодействуют с крупными комплексами, либо вовсе не способны образовывать гетероолигомеры (данные не приведены).

Таким образом, на первом этапе наших исследований мы установили, что, несмотря на значительное сходство, α -кристаллиновые домены пяти малых белков теплового шока заметно отличаются по своей олигомерной структуре и способности встраиваться в олигомеры, образованные полноразмерными белками.

Как уже отмечалось, N-концевые домены малых белков теплового шока отличаются по своим размерам и структуре. Тем не менее, значительная часть малых белков теплового шока содержит в последовательности своего N-концевого домена консервативный мотив sRFLDQxFG, функциональная роль которого до последнего времени оставалась мало изученной.

Участие консервативного sRFLDQxFG мотива N-концевого домена в образовании гомо- и гетероолигомерных комплексов малых белков теплового шока

В ходе исследований мы анализировали влияние точечной замены аргинина и делеции пяти остатков SRLFD на способность к олигомеризации трех малых белков теплового шока (HspB1, HspB5, HspB6). Для этого были получены мутантные формы этих белков, в которых первый остаток Arg в консервативном мотиве был заменен на Ala или было проведено полное удаление указанных пяти наиболее консервативных остатков мотива, и исследованы физико-химические свойства белков дикого типа и их мутантных форм. Оказалось, что точечная мутация R/A или делеция консервативного пентапептида приводит к дестабилизации крупных олигомеров HspB1 и HspB5 и не оказывает существенного влияния на олигомерную структуру HspB6, образующего малые олигомеры (димеры) (данные не представлены). Эти результаты хорошо согласуются с гипотезой о том, что N-концевой домен играет важную роль в образовании крупных олигомеров и принимает лишь незначительное участие в формировании малых олигомеров. Кроме того, оказалось, что эффект удаления положительного заряда, вызванный заменой остатка Arg в N-концевом домене, во многом аналогичен действию фосфоимитирующих мутаций или фосфорилированию определенных остатков в N-концевом домене и сопровождается

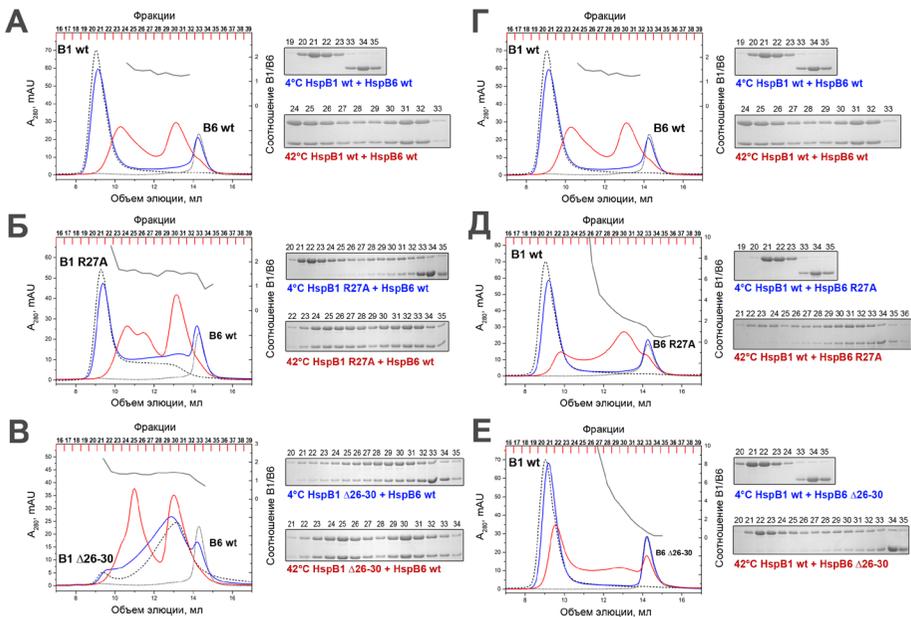


Рис. 5. Исследование олигомерной структуры гетероолигомерных комплексов HspB1/HspB6 методом гель-фильтрации. На панелях изображены профили элюции изолированных белков и их смесей, преинкубированных при 4°C и 42°C. На левой оси отмечено изменение оптической плотности при 280 нм, на правой оси отмечено соотношение HspB1/HspB6, в каждой из фракций, полученных при хроматографии смесей двух белков, преинкубированных при 42°C. Рядом с панелями во врезках показаны результаты электрофоретического анализа фракций, где номера сверху дорожек соответствуют номерам фракций. На отдельных панелях показаны результаты, полученные при анализе смесей следующих малых белков теплового шока HspB1WT/HspB6WT (А, Г), HspB1R27A/HspB6WT (Б), HspB1Δ26-30/HspB6WT (В), HspB1WT/HspB6R27A (Д), HspB1WT/HspB6Δ26-30 (Е). Черным пунктиром обозначен профиль элюции HspB6, черной прерывистой линией – HspB1, синей линией – профиль элюции смесей двух белков, инкубированных при 4°C; красной линией – смесей двух белков, инкубированных при 42°C, серой линией – отмечено соотношение HspB1/HspB6 во фракциях.

ослаблением межсубъединичных контактов и дестабилизацией крупных олигомеров HspB1 и HspB5.

Мы исследовали влияние вышеописанных мутаций на способность малых белков теплового шока образовывать гетероолигомерные комплексы. Как уже отмечалось, точечная мутация R/A или делеция консервативного пентапептида (SRLFD) дестабилизирует олигомерную структуру HspB1, что заметно облегчает возможность формирования гетероолигомерных комплексов с HspB6. Формирование таких комплексов становится возможным уже при низкой температуре и при этом образуются меньшие по размеру гетероолигомерные комплексы, в которых стехиометрия HspB1/HspB6 остается неизменной и равной 1:1 (рис. 5 А, Б, В). Внесение аналогичных мутаций в структуру HspB6 оказывает прямо противоположное влияние на способность этого белка образовывать гетероолигомеры с HspB1. Действительно, внесение этих мутаций не оказывает существенного влияния на четвертичную структуру HspB6, но заметно уменьшает

вероятность формирования гетероолигомеров с HspB1 (рис. 5 Г, Д, Е). Это может быть обусловлено тем, что мутированный N-концевой домен HspB6 не способен прочно взаимодействовать с немодифицированными N-концевыми доменами в крупном олигомере HspB1 дикого типа и поэтому не может эффективно встраиваться в гетероолигомерный комплекс.

Качественно сходные результаты были получены при анализе комплексообразования HspB5 и HspB6 с той разницей, что гомоолигомеры HspB5 очень стабильны и даже внесение указанных мутаций лишь незначительно дестабилизирует такие комплексы. Вследствие этого HspB6 слабо встраивается как в олигомеры HspB5 дикого типа, так и в олигомеры, образованные мутантными формами HspB5. Тем не менее, точно также, как и в случае опытов с HspB1, оказалось, что мутации в N-концевом домене HspB6 уменьшают вероятность его встраивания в олигомеры, образованные HspB5 (данные не приведены).

Завершая этот раздел, можно прийти к следующим заключениям. Увеличение отрицательного заряда путем фосфорилирования, введения фосфоимитирующих мутаций или уменьшение положительного заряда (путем замены R/A) дестабилизирует крупные олигомеры HspB1 и HspB5. В случае HspB1 это упрощает и ускоряет формирование гетероолигомеров HspB1/HspB6. Аналогичные изменения в структуре N-концевого домена HspB6 не приводят к значительным изменениям олигомерной структуры этого белка, но уменьшают вероятность его встраивания в гетероолигомерные комплексы с HspB1 и HspB5.

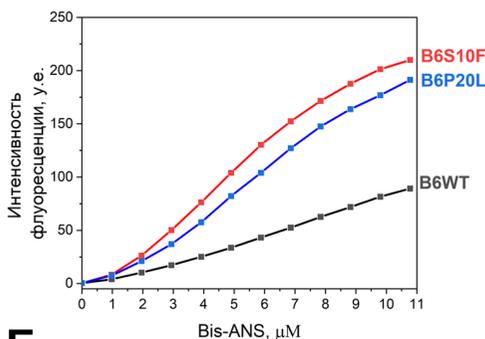
Как бы то ни было, N-концевой домен HspB6 может существенным образом влиять на свойства этого белка. Подтверждением тому стали недавно опубликованные данные из лаборатории профессора Краниас (Kranias), свидетельствующие о том, что точечные мутации в NTD HspB6 коррелируют с развитием некоторых форм кардиомиопатий человека [18, 19]. Поэтому нам показалось целесообразным проанализировать влияние этих недавно обнаруженных мутаций на физико-химические свойства HspB6 человека.

Влияние точечных мутаций S10F и P20L на физико-химические свойства HspB6

HspB6 активно экспрессируется как в скелетной мускулатуре, так и в сердечной мышце [20]. Точечные мутации S10F и P20L ассоциированы с развитием кардиомиопатий и расположены в непосредственной близости от консервативного sRLFDQxFG мотива. Вызванная данными мутациями пониженная кардиопротекторная активность HspB6 приводит к нарушению нормального течения аутофагии в клетке и апоптоза в кардиомиоцитах [21, 22]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе ослабления кардиопротекторной активности, не были подробно изучены и поэтому мы провели сравнение физико-химических свойств HspB6 дикого типа и двух его точечных мутантов.

Точечные замены серина на фенилаланин (S10F) или пролина на лейцин (P20L) должны приводить к изменению гидрофобных свойств N-концевого домена HspB6. Мы провели оценку влияния мутаций на поверхностную гидрофобность HspB6 с помощью зонда bis-ANS. HspB6 дикого типа слабо связывает bis-ANS, что сопровождается лишь небольшим увеличением флуоресценции, которая не достигает насыщения даже при высоких концентрациях гидрофобного зонда (рис. 6 А). В тоже время обе анализируемые мутантные формы эффективно связывают гидрофобный зонд, что сопровождается значительным изменением флуоресценции (рис. 6 А). Эти данные свидетельствуют о том, что анализируемые мутации действительно сопровождаются увеличением поверхностной гидрофобности HspB6. Изменение физико-химических свойств приводит к различным дополнительным эффектам. Оказалось, что анализируемые мутанты обладают

А



Б

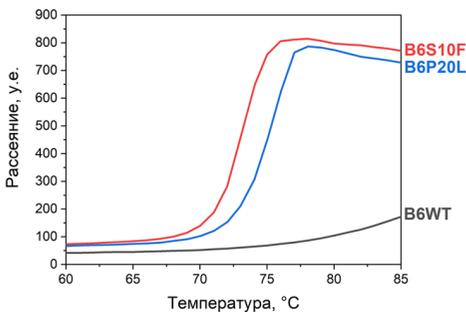


Рис. 6. **А.** Титрование HspB6WT и его точечных мутантов гидрофобным зондом bis-ANS. На графике представлены усредненные результаты не менее трех экспериментов. **Б.** Влияние точечных мутаций на термостабильность HspB6. Нагревание проводили в диапазоне 20-85 °C при скорости нагревания, равной 1 °C/мин. На графике представлены усредненные результаты не менее трех экспериментов.

пониженной термической стабильностью и агрегируют при более низких температурах, чем белок дикого типа (рис. 6 Б). Кроме того, в условиях краудинга, вызванного добавлением триметиламинооксида (ТМАО), анализируемые мутанты склонны ассоциировать с образованием олигомеров большого размера, что нехарактерно для белка дикого типа (рис. 7). Вероятно, в силу повышенной гидрофобности, точечные мутанты HspB6 более эффективно, чем белок дикого типа, связываются с денатурированными модельными белками-субстратами и обладают повышенной шапероноподобной активностью (данные не представлены). Вызванные точечными заменами изменения в физико-химических свойствах HspB6, вероятно, могут приводить к негативным последствиям, потому что увеличением гидрофобности мутантных форм HspB6 может приводить к усилению неспецифического связывания со значительным количеством внутриклеточных белков, что может изменять или нарушать взаимодействие HspB6 с физиологически важными субстратами.

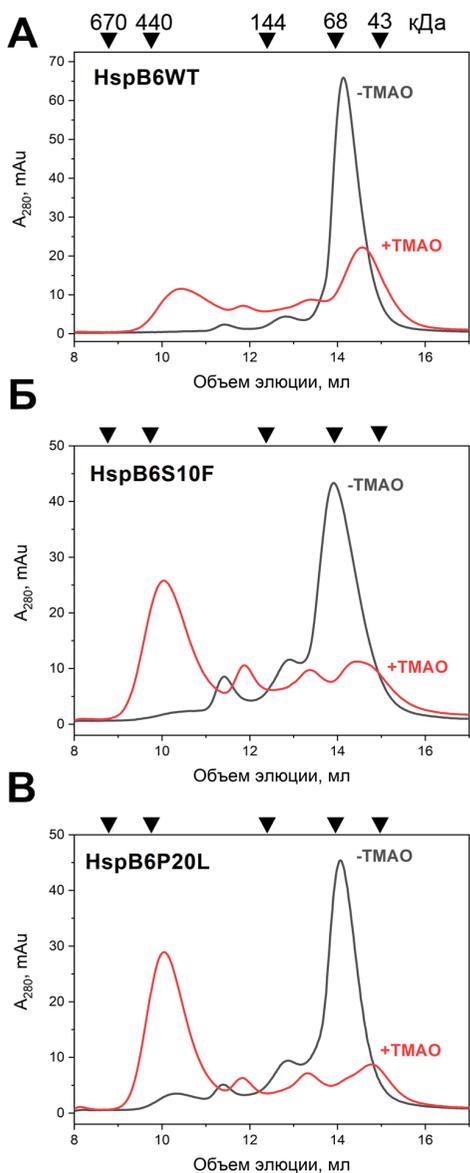


Рис. 7. Анализ влияния краудинга на олигомерное состояние HspB6. Аналитическая гель-фильтрация HspB6WT (А), HspB6S10F (Б) и HspB6P20L (В) в обычных условиях (черная линия, -ТМАО) и в присутствии 0.5 М ТМАО (красная линия, +ТМАО).

Анализируемые мутации не оказывали существенного влияния на способность HspB6 образовывать гетероолигомеры с HspB1. Точечная мутация P20L активировала процесс фосфорилирования HspB6 cAMP-зависимой протеинкиназой, однако мы не обнаружили различий во взаимодействии фосфорилированного белка дикого типа или фосфорилированных мутантных форм HspB6 с его внутриклеточным партнером — универсальным адаптерным белком 14-3-3 (данные не представлены).

Завершая этот раздел, можно заключить, что точечные мутации S10F и P20L, расположенные в N-концевом домене HspB6 и ассоциированные с развитием кардиомиопатий, сопровождаются существенным увеличением гидрофобности, уменьшением термической стабильности и повышением склонности к самоассоциации. Все это в конечном итоге может приводить к уменьшению кардиопротекторной активности HspB6 и развитию кардиомиопатий.

В первом разделе нашей работы мы отмечали, что α -кристаллиновые домены HspB1, HspB5 и HspB6 обладают сходными свойствами, в то время как гомологичные домены HspB7 и HspB8 существенно от них отличаются. Можно было предположить, что не только α -кристаллиновые домены, но и N-концевые домены HspB7 и HspB8 могут влиять на олигомерную структуру и свойства этих достаточно мало изученных малых белков теплового шока.

Особенности строения и свойства N-концевого домена HspB7 и HspB8

Несмотря на то что HspB7 и HspB8 являются представителями семейства малых белков теплового шока, их первичная структура содержит уникальные последовательности, не характерные для других sHsp [23]. Как уже отмечалось, α -кристаллиновые домены этих белков достаточно существенно отличаются от аналогичных доменов других малых белков теплового шока. Помимо этого, α -кристаллиновые домены HspB7 и HspB8 не могут встраиваться в олигомеры, образованные как HspB1 и HspB5 дикого типа, так и в олигомеры, образованные 3D мутантом HspB1 (данные не представлены). В дополнение к этому C-концевой домен этих белков лишен консервативной последовательности IxI, характерной для многих белков теплового шока и играющей важную роль в формировании олигомеров. Поэтому можно было предположить, что в формировании их олигомерной структуры в первую очередь будет участвовать N-концевой домен. Действительно, N-концевая последовательность HspB7 содержит в своей структуре протяженный полисериновый участок, а N-концевой домен HspB8 содержит участок, обогащенный остатками пролина. Все это делало оправданным подробное изучение особенностей строения и свойств N-концевого домена этих белков.

HspB7 является тканеспецифическим белком, экспрессируемым в инсулин-зависимых тканях (сердце, скелетных мышцах, адипоцитах) [24]. До последнего времени было очень мало сведений об олигомерной структуре этого белка. Попытки выделить рекомбинантный HspB7 столкнулись с серьезными проблемами, потому что этот белок либо накапливался в тельцах включения, либо даже после ренатурации выделялся в виде очень больших олигомеров (агрегатов) [23]. В нашей работе мы разработали такой метод экспрессии, в ходе которого значительная часть белка оставалась в растворе и не переходила в тельца включения. Кроме того, используя гидрофобную хроматографию на фенил-сефарозе, мы смогли разделить рекомбинантный HspB7 на две фракции. Одна из этих фракций преимущественно содержала крупные олигомеры/агрегаты белка и была обозначена как HspB7-L (рис. 8 А), а вторая содержала HspB7 преимущественно в виде малых олигомеров и была обозначена как HspB7-S (рис. 8 Б). При этом крупные комплексы HspB7-L, вероятнее всего, представляют из себя нефункциональные агрегаты белка, в то время как малые комплексы HspB7-S могут быть как мономерами, так и димерами или их равновесной смесью и, вероятно, обладают функциональной активностью.

При гель-фильтрации HspB7-L элюируется в виде двух пиков – первого пика с кажущейся молекулярной массой более 600 кДа и второго пика с кажущейся молекулярной массой 36 кДа (рис. 8 А). Изменение количества белка, наносимого на колонку, не влияет на распределение белка в указанных пиках, что свидетельствует об отсутствии равновесия между указанными олигомерными формами. HspB7-S элюируется в виде симметричного пика с кажущейся молекулярной массой 36 кДа и изменение

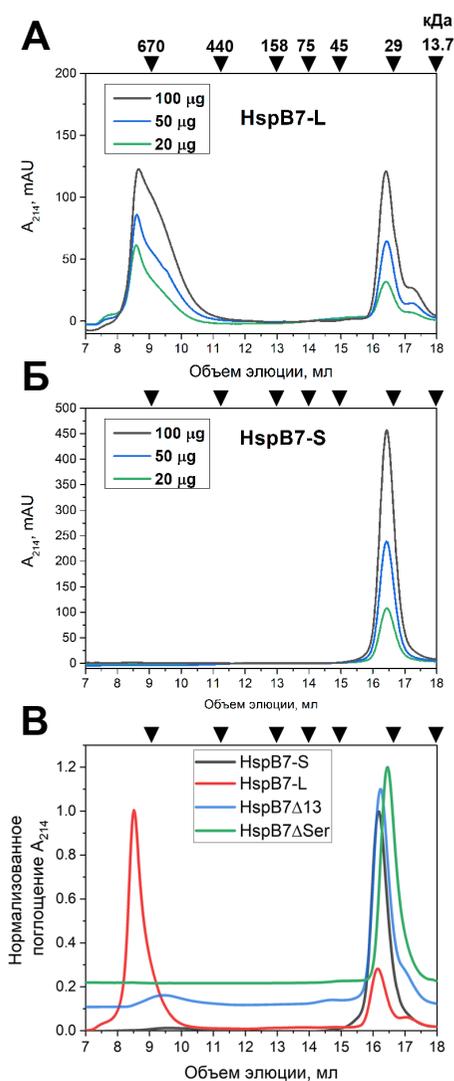


Рис. 8. Аналитическая гель-фильтрация очищенных препаратов HspB7-L (А), HspB7-S (Б). В. Аналитическая гель-фильтрация делеционных мутантов HspB7 Δ 13 и HspB7 Δ Ser. Профили элюции делеционных мутантов смещены по оси ординат на 0.1 и 0.2 деления шкалы. Молекулярные массы белков стандартов указаны над стрелками на панели А.

количества белка, наносимого на колонку, также не влияет на положение пика и его кажущуюся молекулярную массу (рис. 8 Б). Мягкое окисление HspB7-S путем диализа против буфера, не содержащего дитиотрейтола, приводит к накоплению крупных частиц. В тоже время, восстановление HspB7-L избытком дитиотрейтола с последующей модификацией SH-группы йодацетамидом приводит к уменьшению количества крупных олигомеров и накоплению низкомолекулярных форм белка (данные не представлены). Эти результаты свидетельствуют о том, что окисление остатка цистеина, расположенного в β 7 складке, способствует олигомеризации/агрегации HspB7.

На следующем этапе исследований представлялось целесообразным определить, какие участки первичной структуры HspB7 могут способствовать агрегации этого белка. Для этого были получены и исследованы два типа N-концевых делеционных мутантов HspB7, в которых были удалены либо первые 13 аминокислотных остатков (HspB7 Δ 13), либо остатки 17-29 (HspB7 Δ Ser), составляющие полисериновую последовательность (рис. 10). Уже при выделении таких делеционных мутантов не возникало проблем с накоплением крупных агрегатов. Более того, изолированные делеционные мутанты не формировали агрегатов даже после завершения процесса выделения. На профиле элюции при аналитической гель-фильтрации как HspB7 Δ 13, так и HspB7 Δ Ser удается выявить только один пик, объем элюции которого совпадает с объемом элюции HspB7-S (рис. 8. В). Таким образом,

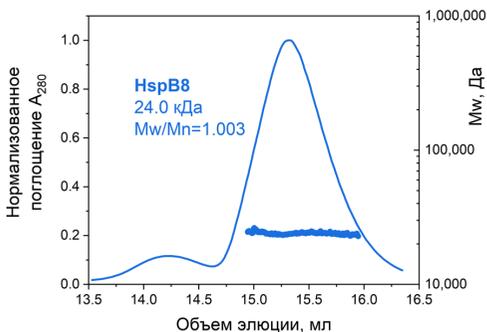


Рис. 9. Определение абсолютной молекулярной массы HspB8 методом аналитической гель-фильтрации, сопряженной с детектором MALS. На колонку наносили 240 мкг белка. Полученная молекулярная масса и индекс полидисперсности указаны рядом с пиком элюции.

коэффициенту экстинкции олигомерное состояние HspB8 в растворе можно достаточно точно определить методом SEC-MALS. Измерение усредненной молекулярной массы HspB8 в пике элюции показывает, что в растворе HspB8 представлен мономерной формой с молекулярной массой в 24.0 кДа (рис. 9), что согласуется с теоретически рассчитанной молекулярной массой мономера (21.5 кДа). Полученные данные об олигомерном состоянии B8ACD (рис. 1 В) и полноразмерного рекомбинантного HspB8 однозначно указывают на то, что основная олигомерная форма HspB8 в растворе представлена мономером. Таким образом, олигомерное состояние HspB8 в растворе в первую очередь определяется особенностями строения его ACD. Тем не менее, в определенных условиях возможно образование димеров HspB8. Так, например, известно, что мутантная форма HspB8Cys, в которой все эндогенные остатки цистеина заменены на остатки серина и введен единственный остаток цистеина в положение 138 (гомологичное Cys137 у HspB1), в окислительных условиях способна образовывать «сшитые» дисульфидной связью димеры [28]. Возможность формирования дисульфидного моста между мономерами HspB8Cys указывает на то, что межмономерный интерфейс димеризации может образоваться в растворе, однако, его стабильность не велика. На прочность интерфейса димеризации также оказывает влияние взаимодействие $\beta 4/\beta 8$ складки ACD с последовательностями, содержащими IxI-мотив [29], которого нет в структуре HspB8. Однако, в клетке основным партнером HspB8 является адаптерный белок BAG3, который содержит в своей структуре два участка, содержащих IxI-мотивы [30]. Можно предположить, что взаимодействие BAG3 и HspB8 приводит к комплексу со стехиометрией 1:2, где два IxI-мотива BAG3 стабилизируют интерфейс димеризации HspB8, позволяя сформировать устойчивый димер.

данные участки N-концевого домена играют важную роль в процессе олигомеризации или агрегации HspB7.

HspB8 экспрессируется практически во всех тканях, где предположительно в составе тройного комплекса Hsp70-BAG3-HspB8 участвует в процессе шаперон-зависимой селективной аутофагии (CASA) [25]. Данные об олигомерном состоянии полноразмерного HspB8 в растворе разнятся. Высказываются предположения о том, что HspB8 представлен в виде димера [26] или равновесной смеси между мономером и димером [27]. Благодаря высокому

N-концевого домена HspB6 в поддержании его структуры и физиологически важных свойств продемонстрирована при исследовании его точечных мутантных форм S10F и P20L, ассоциированных с развитием кардиомиопатий. Указанные мутации приводят к увеличению гидрофобности, понижению термостабильности и изменению шапероноподобных свойств этого белка.

Ко второй группе можно отнести малые белки теплового шока HspB7 и HspB8. Их α -кристаллиновые домены не формируют устойчивых димеров, в N-концевых доменах содержатся уникальные аминокислотные последовательности и sRLFDQxFG мотив либо отсутствует (HspB7), либо представлен в изменённой форме (HspB8) (рис. 10). Особенности строения α -кристаллинового и N-концевого доменов, а также отсутствие консервативного IxI-мотива в С-концевом домене этих белков приводят к тому, что оба этих белка представлены либо в виде малых олигомеров (HspB7), либо в виде мономеров (HspB8). Первые 29 аминокислот N-концевого домена HspB7 играют важную роль в регуляции олигомерного состояния этого белка, а также в его взаимодействии с потенциальными белками-партнерами и в формировании безмембранных внутриядерных структур [20]. Несмотря на особенности первичной структуры N-концевого домена HspB8, который в частности содержит в своей структуре необычный PPPFP мотив, олигомерное строение этого белка определяется в первую очередь особенностями структуры его α -кристаллинового домена, что, вероятно, обеспечивают взаимодействие HspB8 с BAG3 и участие этого малого белка теплового шока в процессах шаперон-зависимой селективной автофагии [25].

Таким образом, точка зрения о том, что эволюция α -кристаллиновых доменов и их N- и С-концевых доменов протекает независимо [31], требует дополнения. По всей видимости, участие N-концевого домена малых белков теплового шока в процессах гомо- и гетероолигомеризации находится в эволюционной связи со строением и функциональными особенностями их α -кристаллиновых доменов, а также наличием или отсутствием IxI-мотива в их С-концевом домене. Все это в совокупности указывает на то, что среди 10 представителей семейства sHsp человека разделение по функциям происходит не только за счет их N-концевых доменов, но и во многом за счет специализации их α -кристаллиновых доменов.

Выводы

1. α -кристаллиновые домены HspB1 (B1ACD), HspB5 (B5ACD) и HspB6 (B6ACD) в растворе представлены в виде димеров, а α -кристаллиновые домены HspB7 и HspB8 - в виде мономеров. Прочность интерфейса димеризации α -кристаллиновых доменов убывает в ряду B1ACD>>B5ACD>B6ACD.
2. Введение отрицательных зарядов в N-концевой домен HspB1 приводит к дестабилизации крупных олигомеров, что способствует включению изолированных α -кристаллиновых доменов в состав олигомера.
3. Консервативный мотив sRLFDQxFG в N-концевом домене играет важную роль в формировании гетероолигомеров малых белков теплового шока. Делеция SRLFD или замена R/A в случае HspB1 и HspB5 дестабилизирует крупные олигомеры и облегчает формирование гетероолигомеров с HspB6. Аналогичная делеция и замена R/A в HspB6 наоборот затрудняют формирование гетероолигомеров с HspB1 и HspB5.
4. Точечные аминокислотные замены S10F и P20L в N-концевом домене HspB6, ассоциированные с развитием кардиомиопатий, приводят к увеличению поверхностной гидрофобности, усилению самоассоциации и увеличению шапероноподобной активности на модельных белках-субстратах, но не влияют на способность HspB6 образовывать гетероолигомеры с HspB1 и HspB5.
5. HspB7 в растворе представлен в виде малых олигомеров, а HspB8 - в виде мономеров. Первые 29 N-концевых остатков могут участвовать в олигомеризации и агрегации HspB7. Необычное олигомерное состояние HspB8 определяется в первую очередь особенностями структуры его α -кристаллинового домена.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах из списка базы данных Web of Science (WoS)

- 1: Муранова Л.К., Рыжавская А.С., Судницина М.В., Шатов В.М., Гусев Н.Б. (2019) Малые белки теплового шока и нейродегенеративные заболевания человека. **Биохимия (Москва)**, 84(11), 1256–1267. **IF 2.487 (WoS)**.
- 2: Shatov V.M., Strelkov S.V., Gusev N.B. (2020) The heterooligomerization of human small heat shock proteins is controlled by conserved motif located in the N-terminal domain. **Int. J. Mol. Sci.**, 21(12), 1–18. **IF 5.923 (WoS)**.
- 3: Shatov V.M., Gusev N.B. (2020) Physico-chemical properties of two point mutants of small heat shock protein HspB6 (Hsp20) with abrogated cardioprotection. **Biochimie**, 174, 126–135. **IF 4.079 (WoS)**.
- 4: Муранова Л.К., Шатов В.М., Букач О.В., Гусев Н.Б. (2021) Сердечно-сосудистый белок теплового шока (cvHsp, HspB7) - необычный представитель семейства малых белков теплового шока. **Биохимия (Москва)**, 86(S1), 1–11. **IF 2.487 (WoS)**.
- 5: Shatov V.M., Sluchanko N.N., Gusev N.B. (2021) Replacement of Arg in the conserved N-terminal RLFDQxFG motif affects physico-chemical properties and chaperone-like activity of human small heat shock protein HspB8 (Hsp22). **PLoS One**, 16(6), 1–15. **IF 3.24 (WoS)**.
- 6: Muranova L.K., Shatov V.M., Slushchev A.V., Gusev N.B. (2021) Quaternary structure and hetero-oligomerization of recombinant human small heat shock protein hspb7 (cvHsp). **Int. J. Mol. Sci.**, 22(15), 1–15. **IF 5.923 (WoS)**.
- 7: Муранова Л.К., Шатов В.М., Гусев Н.Б. (2022) Малые белки теплового шока и актиновые филаменты. **Биохимия (Москва)**, 87(8), 800–811. **IF 2.487 (WoS)**.
- 8: Shatov V.M., Muranova L.K., Zamotina M.A., Sluchanko N.N., Gusev N.B. (2023) alpha-Crystallin domains of five human small heat shock proteins (sHsps) differ in dimer stabilities and ability to incorporate themselves into oligomers of full-length sHsps. **Int. J. Mol. Sci.**, 24(2), 1–15. **IF 5.923 (WoS)**.

Тезисы докладов

- 1: Shatov V.M. (2019) Effect of conservative motif located in the N-terminal region of small heat shock proteins on their heterooligomerization, **sHSP WOG Meeting in Leuven**
- 2: Muranova L.K., Shatov V.M., Slushchev A.V., Gusev N.B. (2022) Some properties of human small heat shock protein HspB7, IUBMB–FEBS–PABMB Congress, Lisbon, Portugal, 9-14 July 2022

Список цитированной литературы

1. Janowska M. K. et al., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2019, **1**(3), p. 1–20.
2. Hipp M. S. et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2019, **20**(7), p. 421–435.
3. Tedesco B. et al., *Front. Mol. Biosci.*, 2022, **9**(2), p. 1–27.
4. Haslbeck M. et al., *J. Biol. Chem.*, 2019, **294**(6), p. 2121–2132.
5. Shatov V. M. et al., *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, **21**(12), p. 1–18.
6. Muranova L. K. et al., *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, **22**(15), p. 1–15.
7. Shatov V. M. et al., *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, **24**(2), p. 1085.
8. Shatov V. M. et al., *Biochimie.*, 2020, **174**, p. 126–135.
9. Mymrikov E. V. et al., *Cell Stress Chaperones.*, 2012, **17**(2), p. 157–169.
10. Muranova L. K. et al., *PLoS One.*, 2015, **10**(5), p. 1–24.
11. Baranova E. V. et al., *J. Mol. Biol.*, 2011, **411**(1), p. 110–122.
12. Hochberg G. K. a et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2014, **111**(16), p. 1562–1570.
13. Heirbaut M. et al., *PLoS One.*, 2014, **9**(8), p. 1–15.
14. Bagn ris C. et al., *J. Mol. Biol.*, 2009, **392**(5), p. 1242–1252.
15. Arrigo A.-P., *FEBS Lett.*, 2013, **587**(13), p. 1959–1969.
16. Delbecq S. P. et al., *Biochemistry.*, 2015, **54**(28), p. 4276–4284.
17. Jovcevski B. et al., *Anal. Chem.*, 2017, **89**(24), p. 13275–13282.
18. Nicolaou P. et al., *J. Biol. Chem.*, 2008, **283**(48), p. 33465–33471.
19. Liu G. S. et al., *J. Cell. Mol. Med.*, 2018, **22**(8), p. 3911–3919.
20. Vos M. J. et al., *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 2009, **1793**(8), p. 1343–1353.
21. Qian J. et al., *Circ. Res.*, 2009, **105**(12), p. 1223–1231.
22. Liu G.-S. et al., *Autophagy.*, 2018, **14**(1), p. 80–97.
23. Muranova L. K. et al., *Biochem.*, 2021, **86**(1), p. 1–11.
24. Krief S. et al., *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**(51), p. 36592–36600.
25. St rner E. et al., *Front. Mol. Neurosci.*, 2017, **10**(17), p. 1–14.
26. Chavez Zobel A. T. et al., *Hum. Mol. Genet.*, 2003, **12**(13), p. 1609–1620.
27. Kasakov A. S. et al., *FEBS J.*, 2007, **274**(21), p. 5628–5642.
28. Mymrikov E. V. et al., *Cell Stress Chaperones.*, 2010, **15**(4), p. 365–377.
29. Baldwin A. J. et al., *J. Mol. Biol.*, 2011, **413**(2), p. 310–320.
30. Rauch J. N. et al., *J. Mol. Biol.*, 2017, **429**(1), p. 128–141.
31. Kriehuber T. et al., *FASEB J.*, 2010, **24**(10), p. 3633–3642.