

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

На правах рукописи

Шатов Владислав Михайлович

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

1.5.4. Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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

Москва – 2023

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1. Система протеостаза клетки	9
2. Строение малых белков теплового шока	13
2.1. Структура α -кристаллинового домена sHsp	14
2.2. Строение C- и N-концевых участков sHsp	16
2.2.1. Структура C-концевого участка.	16
2.2.2. Структура N-концевого участка	17
3. Строение высокомолекулярных комплексов sHsp человека.....	20
4. Роль N-концевого участка в регуляции олигомерного состояния и шапероноподобной активности sHsp.....	24
5. Гетероолигомерные комплексы малых белков теплового шока.....	26
6. Взаимодействие малых белков теплового шока с белками-партнерами	30
6.1. Комплекс HspB6 с белком 14-3-3	30
6.2. Взаимодействие sHsp с белком-адаптером BAG3	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
1. Получение плазмид и генно-инженерных конструкции.....	37
2. Приготовление компетентных клеток и их трансформация	38
3. Экспрессия белков	38
4. Выделение и очистка малых белков теплового шока	39
5. Очистка и выделение белков-партнеров	42
6. Методы исследования структуры и свойств белков	43
6.1. Флуоресцентные методы исследования.....	43
6.2. Измерение шапероноподобной активности малых белков теплового шока.....	44
6.3. Фосфорилирование HspB6 сАМР-зависимой протеинкиназой.....	44
7. Четвертичная структура и белок-белковые взаимодействия в гомо- и гетероолигомерах малых белков теплового шока	45
7.1. Анализ четвертичной структуры sHsp и α -кристаллиновых доменов.....	45
7.2. Исследование белок-белковых взаимодействий в гетероолигомерных комплексах sHsp.....	46
7.3. Исследование олигомерного состояния α -кристаллиновых доменов методом динамического светорассеяния.....	47
7.4. Анализ олигомерного состояния α -кристаллиновых доменов методом химического сшивания	47
8. Некоторые аналитические методы.....	47
8.1. Определение концентрации белка по методу Бредфорда.....	47
8.2. Электрофорез в присутствии мочевины по методу Перрье-Перри	48
8.3. Tricine-SDS электрофорез по методу Шаггера и фон Яагова.....	48
8.4. Нативный электрофорез	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	50
1. Получение препаратов белков.....	50
1.1. Выделение малых белков теплового шока	50
1.1.1. Стандартный протокол выделения.....	50
1.1.2. Экспрессия и выделение HspV7	51
2. Анализ олигомерного состояния α -кристаллиновых доменов различных малых белков теплового шока человека.....	54

3. Влияние N-концевого домена на встраивание α -кристаллиновых доменов в состав олигомеров полноразмерных малых белков теплового шока.....	58
4. Участие консервативного sRLFDQxFG мотива N-концевого домена в образовании гомо- и гетероолигомерных комплексов малых белков теплового шока	64
5. Влияние точечных мутаций S10F и P20L на физико-химические свойства HspB6.....	70
6. Особенности строения и свойства N-концевого домена HspB7 и HspB8.....	78
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	88
ВЫВОДЫ	91
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	92
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	94
БЛАГОДАРНОСТИ	104
Приложение 1	105
Приложение 2	106
Приложение 3	107
Приложение 4	108
Приложение 5	109
Приложение 6	110
Приложение 7	111

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АА – акриламид
β-МЭ – бета-меркаптоэтанол
БСА – бычий сывороточный альбумин
ДМСО - диметилсульфоксид
ДТТ – дитиотреитол
МБА - N,N'-метиленбисакриламид
ПААГ – полиакриламидный гель
ПСА – персульфат аммония
ТЕМЕД - N,N,N',N'-Тетраметилэтилендиамин
ТМАО – триметиламиноксид
Трис - 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол
ФМСФ - фенилметилсульфонил фторид
ЭПР – эндоплазматический ретикулум
ЯМР – ядерный магнитный резонанс
ACD – α-кристаллиновый домен (α-crystallin domain)
АНА1 – кошаперон Hsp90, активатор АТФазы Hsp90 (Activator of Hsp90 ATPase protein 1)
BAG3 – адаптерный белок (BCL2 associated athanogene 3)
bis-ANS - 4,4'-дианилино-1,1'-бинафтил-5,5'-дисульфоновая кислота
CV – объем колонки
сАМР – циклоАМФ
LB - Lysogenia Broth, Luria Broth, среда Luria-Bertani
FUS – РНК-связывающий белок (FUsed in Sarcoma)
НОР – кошаперон, связывающий Hsp70 и Hsp90 (Hsp70-Hsp90 Organizing Protein)
Hsp – heat shock protein
IPTG - Изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид
p23 – кошаперон Hsp90, с молекулярной массой около 23 кДа
P-body – безмембранные органеллы цитоплазмы клеток эукариот, где происходит процессинг и хранение мРНК (processing bodies)
PDB – база данных структур белков (Protein Data Bank)
RedOx статус – окислительно-восстановительный статус
SDS – Sodium dodecyl sulfate
SB - Super Broth
sHsp – small heat shock protein
TDP-43 – ДНК и РНК-связывающий белок с молекулярной массой 43 кДа (Transactive response DNA binding Protein 43 kDa)
TRiC – шаперон цитоплазмы эукариот (T-complex protein Ring Complex)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Малые белки теплового шока (sHsp) - широко распространённая группа АТФ-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 АТФ-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 $\beta 7$ 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 $\beta 4/\beta 8$ 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 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.

Цели и задачи работы

Целью данной работы 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

Результаты работы были доложены на заседаниях 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

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Система протеостаза клетки

Белковый состав клетки (протеом) состоит из множества взаимодействующих между собой молекул. Даже небольшие нарушения в работе этого набора белков, вызванные мутациями, неблагоприятными факторами внешней среды или токсическими веществами, могут значительно снижать жизнеспособность клетки. На самых ранних этапах эволюции клеточных организмов можно проследить возникновение системы протеостаза, отвечающей за контроль каждого из этапов созревания и функционирования полипептидных цепей в клетке [5]. Система протеостаза состоит из специализированных белков-шаперонов (белков теплового шока), которые в свою очередь можно разделить на две группы: непосредственно белки-шапероны и вспомогательные белки-кошапероны [6, 2]. Гены, отвечающие за поддержание протеостаза, составляют значимую долю от всех генов живых организмов, при этом некоторые гены шаперонов обнаруживаются даже в геномах вирусов [7, 8]. Наибольшее разнообразие белков теплового шока характерно для эукариотических клеток, что логичным образом связано с увеличением количества белков в их протеоме и одновременным повышением средней длины всех полипептидных цепей, а также нарастающей сложностью их пространственной организации [5]. Белки теплового шока эукариот принято разделять на несколько семейств (Таблица 1), представители которых отличаются друг от друга молекулярной массой мономеров и функциями в клетке [2]. Все компоненты системы протеостаза клетки функционируют в тесной кооперации друг с другом и часто не только взаимно дополняют друг друга, но и могут компенсировать функционирование части системы при ее дефекте или дисфункции.

Основной задачей белков теплового шока в клетке является поддержание и сохранение пространственных структур белков. Полипептидная цепь приобретает свою пространственную структуру в ходе сворачивания (фолдинга). Сворачивание начинается уже в процессе синтеза белка на рибосоме и продолжается в дальнейшем в цитоплазме или иных компартментах клетки (ЭПР, митохондрия). Фолдинг белка является самопроизвольным процессом, где полипептидная цепь шаг за шагом приходит к состоянию минимальной свободной энергии, приобретая нативную конформацию. В процессе фолдинга гидрофобные участки полипептидной цепи, исходно экспонированные в раствор, постепенно погружаются внутрь третичной структуры белка, что позволяет минимизировать свободную энергию всей цепи и создать движущую силу сворачивания. Некоторые мутации или воздействия неблагоприятных условий среды, а также действие токсических соединений на клетку могут вызывать потерю белком его нативной конформации и как следствие приводить к его полной или частичной денатурации. При

денатурации многих белков их гидрофобные участки становятся экспонированными в раствор, что приводит к их неспецифическому взаимодействию друг с другом и в конечном счете вызывает накопление в клетке аморфных агрегатов белков. Существует также и другой механизм, приводящий к упорядоченной агрегации. Так, некоторые белки при изменении своей конформации приобретают структуру, обогащенную β -складками, и могут агрегировать с образованием длинных фибриллярных структур (амилоидов).

Таблица 1. Краткая характеристика основных семейств шаперонов эукариот и некоторые их свойства [2, 9].

Семейство белков теплового шока	Свойства мономера белка	Функции
Hsp110 (HspH)	~100 кДа Обладает АТРазной активностью	Кошаперон Hsp70. Выполняет функцию фактора обмена нуклеотидов. Участвует в процессе сворачивания и разборке агрегатов белков.
Hsp100	~100 кДа Обладает АТРазной активностью	Белки семейства AAA+, выполняющие функцию разборки агрегатов в грибах, бактериях и хлоропластах растений. Образуют гексамерное кольцо. В ходе функционирования взаимодействуют с Hsp70/Hsp40.
Hsp90 (HspC)	~90 кДа Обладает АТРазной активностью	В составе гомодимера регулирует активность многих белков и ферментов. Поддерживает структуру стероидных рецепторов, некоторых видов протеинкиназ и других сигнальных белков.
Hsp70 (HspA)	~70 кДа Обладает АТРазной активностью	Одно из основных семейств белков-шаперонов. Представители локализованы в цитоплазме, матриксе митохондрий, ЭПР. Участвуют в процессах котрансляционного сворачивания белка, рефолдинга, разборки агрегатов и др. Взаимодействуют с кошаперонами Hsp40 и Hsp110.
Hsp60 (HspD)	~60 кДа Обладает АТРазной активностью	Шаперонин матрикса митохондрии. Образует крупный комплекс, состоящий из двух гептамерных колец. Вместе с кошапероном Hsp10 участвует в сворачивании некоторых митохондриальных белков.
TRiC (CCT)	~60 кДа Обладает АТРазной активностью	Шаперонин цитозоля клетки. Образует крупный комплекс из двух октамерных колец. Участвует в сворачивании многих важнейших белков клетки, включая актин и тубулин.
Hsp40 (DNAJ)	~40 кДа Кошаперон	Кошаперон Hsp70. Семейство состоит из большого числа представителей. Доставляют неправильно упакованные белки к Hsp70, регулируют его каталитический цикл и обеспечивают его внутриклеточную локализацию.
sHsp (HspB)	~12-45 кДа АТР-независимые	Могут формировать крупные мультисубъединичные комплексы. Препятствуют агрегации белков. Могут передавать связанные денатурированные белки для дальнейшего рефолдинга АТР-зависимым шаперонам.

В скобках указана классификация, предложенная для белков теплового шока человека Воз (Vos) и соавторами [10].

Такие фибриллы способны быстро расти и, как следствие, нарушать нормальное функционирование клетки. Например, фибриллы обнаруживаются в ходе развития таких

заболеваний, как болезнь куру, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, фатальная семейная бессонница и многих других [11].

В особую категорию выделяют белки, содержащие в своем составе домены без выраженной структуры (low-complexity domains). Важным свойством таких белков является их способность формировать в цитоплазме безмембранные тельца за счет взаимодействия таких доменов между собой и с нуклеиновыми кислотами. Например, РНК-связывающие ядерные белки FUS и TDP-43 в цитоплазме могут включаться в состав безмембранных структур или стрессовых гранул (P-body, stress granule) [12]. По мало изученным причинам такие компартиментализованные белки могут со временем переходить в прионоподобную форму и формировать агрегаты необычного строения [13, 14]. Подобные патологические процессы протекают в ходе развития бокового амиотрофического склероза, лобно-височной деменции и болезни Альцгеймера [12, 2].

Система протеостаза образует обширную сеть взаимодействующих компонентов, активно противодействующих денатурации белков в клетке. Тем не менее, в ходе старения или сильного стресса функционирование системы протеостаза ослабевает, что неизбежно приводит к гибели клеток [2]. Таким образом, исследование принципов функционирования системы шаперонов необходимо для понимания возникновения и течения патологических процессов в клетке и поиска методов лечения многих заболеваний, связанных с возрастными изменениями.

Принципы работы белков теплового шока являются в определенной мере универсальными. Они основаны на способности шаперонов узнавать гидрофобные участки на поверхности белков, потерявших нативную структуру, связывать их и подвергать ренатурации. Обобщая, можно сказать, что при действии шаперонов на полипептидную цепь с нарушенной конформацией она проходит через серию каталитических циклов сворачивания и разворачивания до тех пор, пока её неправильно упакованные участки вновь не приобретут нативную конформацию. Энергия, необходимая для сворачивания-разворачивания цепи, обеспечивается конформационными перестройками в структуре самого шаперона, который в свою очередь использует энергию гидролиза АТФ [9].

Рассмотрим теперь более подробно представителей каждого семейства белков теплового шока. Одним из наиболее распространённых белков-шаперонов в клетке является Hsp70. Для его функционирования также необходимы кошапероны Hsp40 и Hsp110. Hsp40 выполняет двоякую функцию, с одной стороны, связывая денатурированный белок-субстрат, он способствует привлечению Hsp70, а с другой стороны Hsp40 ускоряет гидролиз АТФ, регулируя каталитическую активность Hsp70. Обмен ADP на АТФ в активном центре Hsp70 осуществляется

факторами обмена нуклеотидов, такими как белок теплового шока Hsp110 [12] или универсальный белок-адаптер BAG3 [15].

Белки семейства Hsp90 участвуют во многих процессах передачи сигнала в клетке. Их субстратами являются протеинкиназы, транскрипционные факторы и рецепторы стероидных гормонов, всего более 200 белков. Считается, что механизм действия димера Hsp90 основан на связывании белков-субстратов, находящихся в конформационно неактивном состоянии и последующем переводе этих структур в активную форму. Детальный механизм работы Hsp90 до сих пор остается предметом дискуссий, однако, известно, что для его функционирования также необходимо большое количество кошаперонов, таких как HOP, ANA1, p23 и др. [16].

В особую группу выделяют белки теплового шока, обозначаемые как шаперонины. Hsp60 в клетке эукариот встречается в матриксе митохондрии и хлоропласте, где формирует крупный комплекс в 800-900 кДа, состоящий из двух гептамерных кольцевых структур, соединенных друг с другом у основания. В его состав также входит вспомогательный кошаперон Hsp10. Субстратами Hsp60 выступают гидрофобные белки, транспортируемые в соответствующие органеллы. В цитоплазме эукариотической клетки расположен другой шаперонин TRiC (CCT). Структурно он гомологичен Hsp60, однако устроен иначе. Его структура состоит из двух октамерных колец, формирующих комплекс размером около 1 МДа. Среди субстратов TRiC представлены белки цитоскелета актин и тубулин, обладающие сложной пространственной организацией [17, 9].

Специальной активностью, обеспечивающей разрушение белковых агрегатов, обладают представители семейства Hsp100. Эти белки активно экспрессируются во время стресса в клетках бактерий, грибов, простейших и растений. Они обладают способностью к разборке крупных белковых агрегатов при кооперации с системой Hsp70/Hsp40. Мономеры Hsp100 формируют гексамерное кольцо, сквозь которое при затрате энергии АТФ могут «протягиваться» цепи денатурированных белков [17].

Представители семейства малых белков теплового шока sHsp (small heat shock protein) составляют отдельный класс шаперонов. sHsp являются АТФ - независимыми шаперонами и выполняют роль белков, экранирующих гидрофобные участки на поверхности денатурированных белков. Эта так называемая холдазная (holdase) активность (по-другому шапероноподобная активность) особенно важна в клетке при условии 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 АТФ-зависимого рефолдинга белка и избежать пагубных последствий для жизнедеятельности клетки. В геноме человека обнаружено десять

представителей малых белков теплового шока (HspB1-HspB10) (Таблица 2). Характерной чертой всех sHsp является наличие консервативного α -кристаллинового домена (ACD) в их структуре, небольшая молекулярная масса мономеров и способность большинства представителей формировать крупные гомо- и гетероолигомерные комплексы, достигающие размеров до 1 МДа [18, 19, 6, 20].

Таблица 2. Характеристики представителей семейства HspB человека.

Название	Другое обозначение	Номер в базе данных Uniprot	Молекулярная масса мономера, Да	Олигомерное состояние [21]	Локализация и тканевая специфичность [22]
HspB1	Hsp25, Hsp27, Hsp28	P04792	22783	Крупные олигомеры	Повсеместно
HspB2	МКБР (myotonic dystrophy protein kinase binding protein)	Q16082	20233	Небольшие олигомеры	Сердечная и скелетная мускулатура
HspB3		Q12988	16966	Небольшие олигомеры	Сердечная и скелетная мускулатура
HspB4	α A-кристаллин	P02489	19909	Крупные олигомеры	Хрусталик глаза
HspB5	α B-кристаллин	P02511	20159	Крупные олигомеры	Повсеместно
HspB6	Hsp20, p20	O14558	17136	Малые олигомеры	Повсеместно
HspB7	cvHsp (cardiovascular heat shock protein)	Q9UBY9	18611	Смесь олигомеров*	Сердечная и скелетная мускулатура
HspB8	Hsp22, H11	Q9UKS3	21604	Малые олигомеры	Повсеместно
HspB9	CT51	Q9BQS6	17486	?	Семенники
HspB10	ODFP1 (outer dense fiber protein)	Q14990	28366	?	Семенники

? – Данные об олигомерном состоянии отсутствуют

* - Крупные олигомеры могут состоять из агрегатов HspB7

2. Строение малых белков теплового шока

Малые белки теплового шока - это разнообразная группа шаперонов, представленная практически во всех живых организмах. Для этих белков характерна небольшая молекулярная масса от 12 до 45 кДа [23]. Первичную структуру практически всех малых белков теплового шока можно разбить на три части (рис. 1 А). В центральной части sHsp, расположен α -кристаллиновый домен (ACD), обычно состоящий из 90-100 аминокислот. С N- и C-концов α -кристаллиновый домен фланкирован мало консервативными последовательностями, чья длина может сильно отличаться у представителей разных групп живых организмов [24]. ACD имеет Ig-подобную структуру, состоящую из 8 (у бактерий и растений) и 7 (у млекопитающих) β -складок (рис. 1 Б, В) [18]. Отличительной особенностью sHsp является их способность к олигомеризации и формированию сложноорганизованных мультисубъединичных комплексов, включающих до 40 субъединиц [25, 26, 27, 28]. Столь вариабельная четвертичная структура формируется благодаря динамичным многоточечным взаимодействиям α -кристаллиновых доменов с подвижными N- и

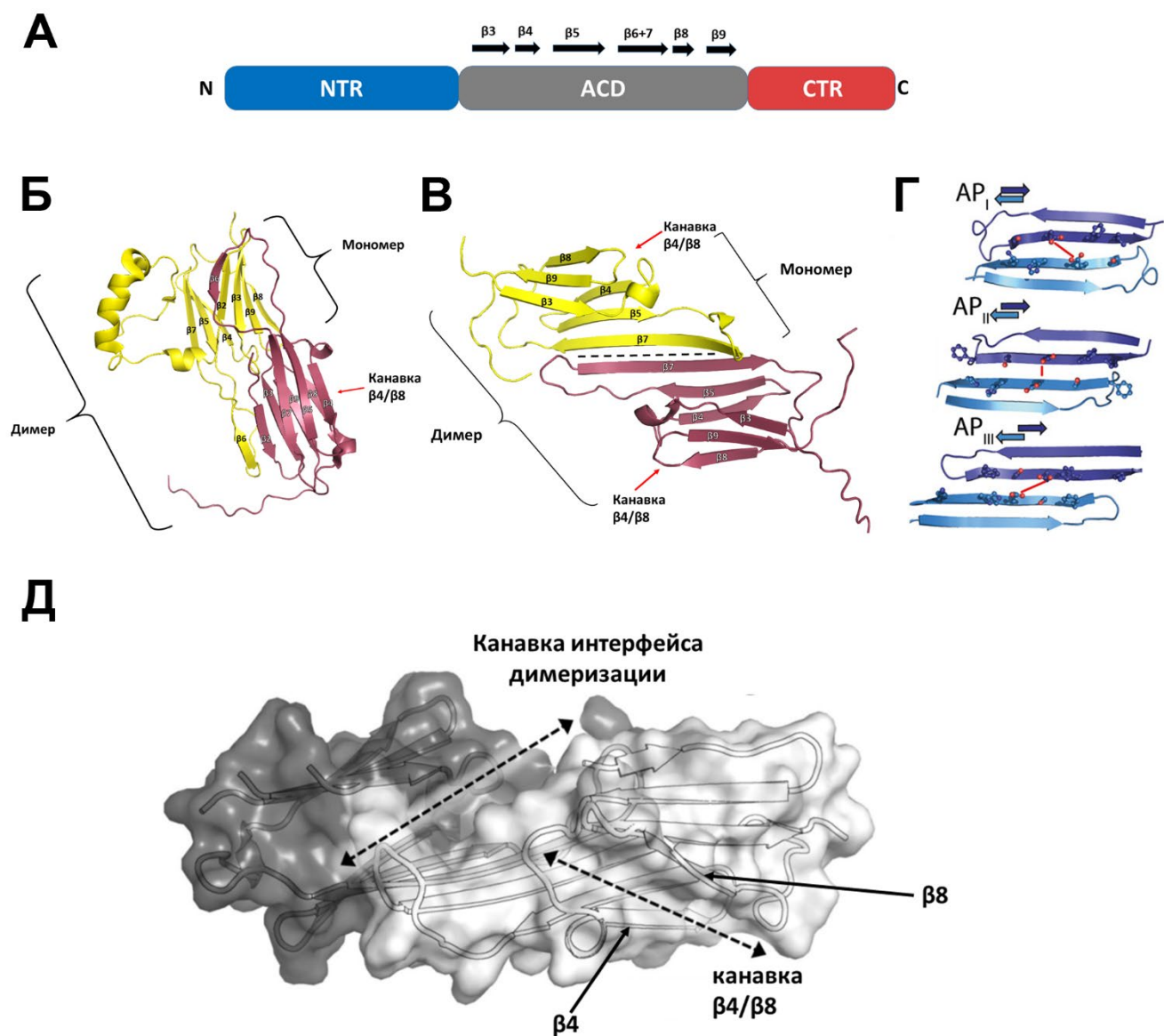


Рис. 1. А. Схема структурной организации малых белков теплового шока человека. N-концевой участок (NTR) (синий), α -кристаллиновый домен (ACD) (серый), C-концевой участок (CTR) (красный), Черными стрелками указаны β -складки в структуре ACD. Б. Трехмерная структура димера Hsp16.9 из *T. aestivum*. (PDB ID: 1GME). В. Трехмерная структура димера HspB1 человека. Указаны номера β -складок. Прерывистой линией показан интерфейс димеризации. Красной стрелкой обозначен «карман» из $\beta 4/\beta 8$ складок, участвующий во взаимодействии с I χ I мотивом C-концевого участка. Рисунок сделан в программе PyMOL на основе структуры (PDB ID: 2N3J). Г. Варианты взаимного расположения (API, APII, APIII) $\beta 6+7$ складок мономера в составе димера sHsp [42]. Д. Структура гомодимера ACD HspB1 (PDB ID: 4MJH). Пунктирными линиями показаны карманы на поверхности структуры, способные взаимодействовать с разными субстратами. Молекулярные поверхности двух мономеров отмечены светло- и тёмно-серыми цветами. Адаптировано из [68].

C-концами молекулы белка [29, 30]. Детали процесса мультимеризации и конкретные механизмы формирования структур этих олигомеров до сих пор остаются мало изученными.

2.1. Структура α -кристаллинового домена sHsp

Исследование третичной и четвертичной структуры малых белков теплового шока затруднено из-за высокой подвижности N- и C-концевых участков, а также полидисперсной

организации олигомеров в растворе. Тем не менее, на данный момент удалось закристаллизовать достаточно много малых белков теплового шока прокариот и растений. Так, на сегодняшний день известны структуры Hsp16.5 археи *Methanococcus jannaschii* (PDB ID: 1SHS) [25], Hsp 16.9 пшеницы *Triticum aestivum* (PDB ID: 1GME) [27], Tsp36 плоского червя *Taenia saginata* (PDB ID: 2BOL) [31], StHsp14.0 бактерии *Sulfolobus tokodaii* (PDB ID: 2VQK) [32], ХаHspA бактерии *Xantomonas axonopodis* (PDB ID: 3GT6) [33], SpHsp16.0 дрожжевого гриба *Schizosaccharomyces pombe* [34]. sHsp млекопитающих оказались значительно более сложным объектом для структурных исследований. Большая часть информации об устройстве sHsp млекопитающих была получена при исследовании изолированных α -кристаллиновых доменов. Так известны структуры изолированных α -кристаллиновых доменов HspB4 (PDB ID: 3L1E) и HspB5 (PDB ID: 2Y22) [35, 36] и HspB1 человека (PDB ID: 3Q9P) [37], а также HspB6 человека (PDB ID: 4JUS) [38] и крысы (PDB ID: 2WJ5) [35]. Структура ACD сохраняется и в полноразмерных белках. Так закристаллизованы структуры комплекса полноразмерного HspB6 и 14-3-3 (PDB ID: 5LTW)[39], комплекса HspB2/B3 (PDB ID: 6F2R)[40] и HspB1 человека¹ (PDB ID: 6DV5) [41].

Анализ кристаллических структур малых белков теплового шока позволил определить общие принципы организации олигомеров этих белков. Базовым блоком для всех малых белков теплового шока является димер, который формируется за счет взаимодействий между α -кристаллиновыми доменами мономеров. Механизмы, лежащие в основе димеризации sHsp прокариот, растений и грибов, отличны от таковых для sHsp млекопитающих. В первом случае β 6-складка одного мономера взаимодействуют с β 2-складкой соседнего мономера (рис. 1 Б). У sHsp млекопитающих β 6-складка слилась с соседней β 7-складкой и α -кристаллиновые домены соседних мономеров димеризуются напрямую, за счет антипараллельного интерфейса между β 7 складками (иногда в литературе для этой складки применяется обозначение β 6+7) (рис. 1 В). При этом положение мономеров относительно друг друга может отличаться, допуская смещение вдоль оси интерфейса димеризации. В литературе принято обозначать взаиморасположение мономеров как AP_I, AP_{II} и AP_{III} [42]. Различие между AP регистрами связано со степенью перекрытия β 7 складок (рис. 1 Г). Данные последних лет, полученные при использовании ЯМР, показывают, что вероятнее всего AP_I и AP_{III} интерфейсы являются артефактами кристаллизации, а в растворе в нативном состоянии димеры находятся в AP_{II} регистре [42, 43]. Устойчивость интерфейса димеризации обеспечивается не только водородными связями между β -складками и дополнительно может стабилизироваться ионными мостиками [42, 36].

¹ Стоит отметить, что за все время работы авторам удалось получить всего 2 небольших кристалла HspB1, причем воспроизвести условия, при которых HspB1 кристаллизуется в дальнейшем не удалось.

Поверхность ACD содержит две протяженные канавки (рис. 1 Д), участвующие в связывании различных субстратов. Замечено, что канавка, сформированная на поверхности интерфейса димеризации, может связывать некоторые гидрофобные молекулы [44] или заряженные участки N-концевой последовательности sHsp [1]. Канавка, сформированная $\beta 4/\beta 8$ складками, взаимодействует с IxI-мотивом, расположенным у некоторых sHsp на C-конце молекулы белка [45], а также с IxI-подобными мотивами белков-партнеров [46].

2.2. Строение C- и N-концевых участков sHsp

Как уже было сказано, N- и C- концевые участки представляют значительно более сложный объект для исследований по сравнению с α -кристаллиновым доменом. Многочисленные экспериментальные работы показали, что концевые последовательности одинаково важны и в формировании олигомеров и при определении шапероноподобной активности [47, 42, 48, 49, 50, 51, 52]. Анализ первичной структуры указывает на то, что N- и C-концевые участки sHsp обладают аминокислотным составом, склонным к внутренней разупорядоченности (intrinsically disordered) [53]. Таким образом, в мономере малого белка теплового шока сочетаются как упорядоченные, так и разупорядоченные участки структуры. Этот факт хорошо согласуется с филогенетической историей семейства sHsp, где, как показывает биоинформатический анализ, эволюция N- и C-концевых участков протекала параллельно и независимо от консервативного центрального α -кристаллинового домена и, по-видимому, обеспечила широкую субстратную и функциональную специфичность малых белков теплового шока [24]. Наиболее точные данные о строении N- и C-концевых участков получены при исследовании кристаллических структур sHsp из архей, растений и дрожжей и значительно меньше известно про концевые участки у Metazoa.

2.2.1. Структура C-концевого участка.

Исходно при исследовании структуры sHsp C-концевому участку отводилась определяющая роль в формировании четвертичной структуры sHsp. Уже в первых кристаллических структурах было обнаружено, что протяженные участки C-концевой последовательности принимают непосредственное участие в формировании межсубъединичных контактов [25, 27, 54]. В первичной структуре C-концевого участка был выявлен короткий IxI-мотив, взаимодействующий с $\beta 4/\beta 8$ канавкой кристаллинового домена соседнего (или того же) димера. В дальнейшем аналогичные контакты были обнаружены и в других кристаллических структурах sHsp [36, 42, 55], причем удаление C-концевого участка или мутации в последовательности, содержащей IxI-мотив, приводили к диссоциации [36, 51] или перестройке крупных олигомерных комплексов [56, 49].

В дальнейшем с помощью метода ЯМР было установлено, что С-концевой участок проявляет значительно большую молекулярную подвижность, чем ранее предполагалось. В структурах sHsp млекопитающих в растворе С-концевая последовательность связывается с $\beta 4/\beta 8$ канавкой, однако, это взаимодействие носит слабый и непродолжительный характер. По всей видимости, С-концевой участок может находиться в 3-х состояниях (рис. 2): 1) взаимодействовать с α -кристаллиновым доменом соседнего димера; 2) оставаться экспонированным в раствор или 3) связываться с $\beta 4/\beta 8$ канавкой своего димера [57, 58, 59]. Кроме того, данные полученные методами масс-спектрометрии указывают на иной механизм участия IxI-мотива в олигомеризации. Так, взаимодействие IxI-мотива с $\beta 4/\beta 8$ канавкой наоборот дестабилизирует структуру димера и провоцирует его диссоциацию до мономеров, что должно

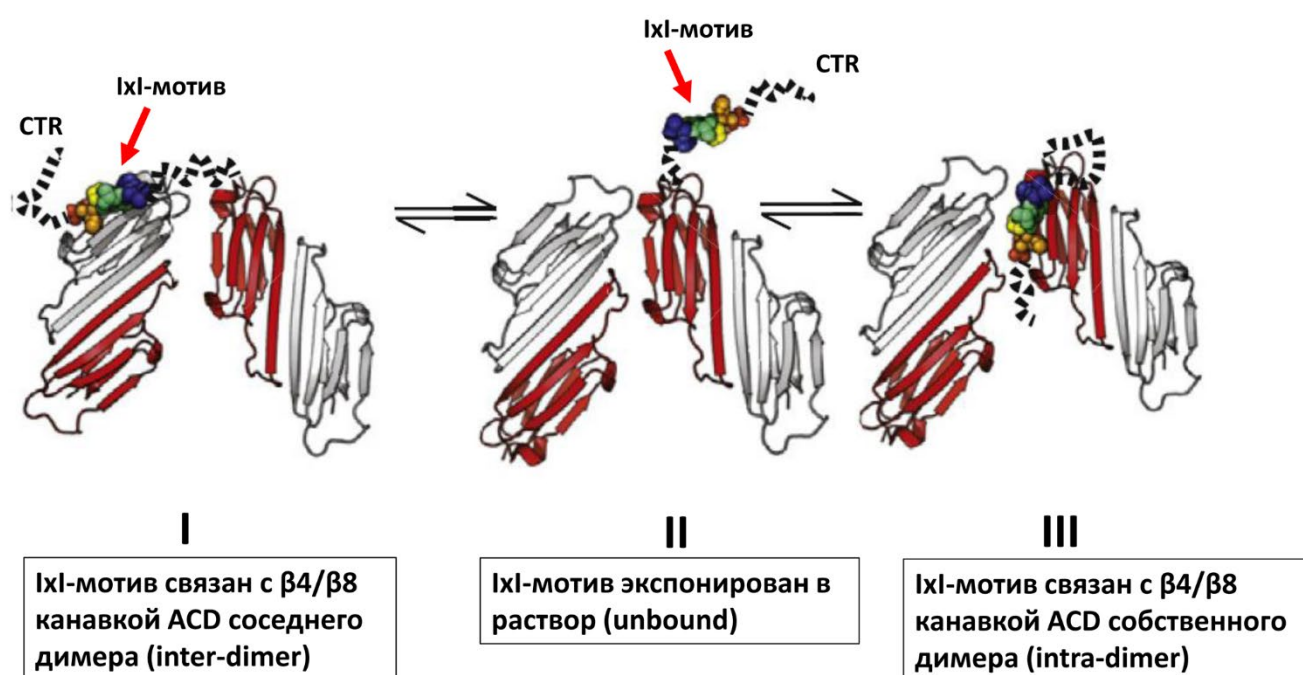


Рис. 2. Возможные состояния С-концевого участка (CTR), содержащего IxI-мотив. Положение С-концевого участка в растворе может динамически изменяться между тремя состояниями. Большую часть времени С-концевой участок находится в свободной форме, однако, он может связываться с $\beta 4/\beta 8$ канавкой соседнего димера (inter-dimer) или внутримолекулярно с $\beta 4/\beta 8$ канавкой собственного димера (intra-dimer). Красным и серым обозначены мономеры sHsp, а положение IxI-мотива указано красной стрелкой. Адаптировано из [166].

способствовать обмену субъединиц в структуре олигомера [60]. Так или иначе, динамичное движение С-конца является важным фактором, определяющим процесс ассоциации и диссоциации субъединиц в олигомерном комплексе [61], и может влиять на способность малых белков теплового шока предотвращать агрегацию белков субстратов [42].

2.2.2. Структура N-концевого участка

Несмотря на многие годы исследований, структура N-концевого участка малых белков теплового шока остается предметом активной дискуссии. Первичная структура этого участка в

среднем состоит из 55 аминокислотных остатков, достигая максимального значения в 75 остатков в группе Metazoa [62]. Аминокислотный состав N-конца богат как ароматическими (триптофан, фенилаланин), так и заряженными аминокислотами (аргинин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты), кроме того, в этом участке содержится достаточно много остатков пролина и глицина. По совокупности данных можно сделать вывод, о том, что первичная структура этого участка сходна со структурой внутренне разупорядоченных белков (intrinsically disordered protein) [53].

В геноме человека представлено 10 генов малых белков теплового шока. Причем каждый sHsp человека обладает уникальным по первичной структуре N-концевым доменом. У некоторых представителей в начале N-концевого домена можно обнаружить небольшой консервативный участок, который получил название sRLFDQxFG-мотива (рис. 3). Нарушения в этом участке влияют, как на олигомерное строение, так и на шапероноподобную активность малых белков теплового шока [48, 63, 64, 65, 66, 47], что указывает на важную роль этой последовательности как в процессе построения четвертичной структуры олигомеров, так и при функционировании sHsp.

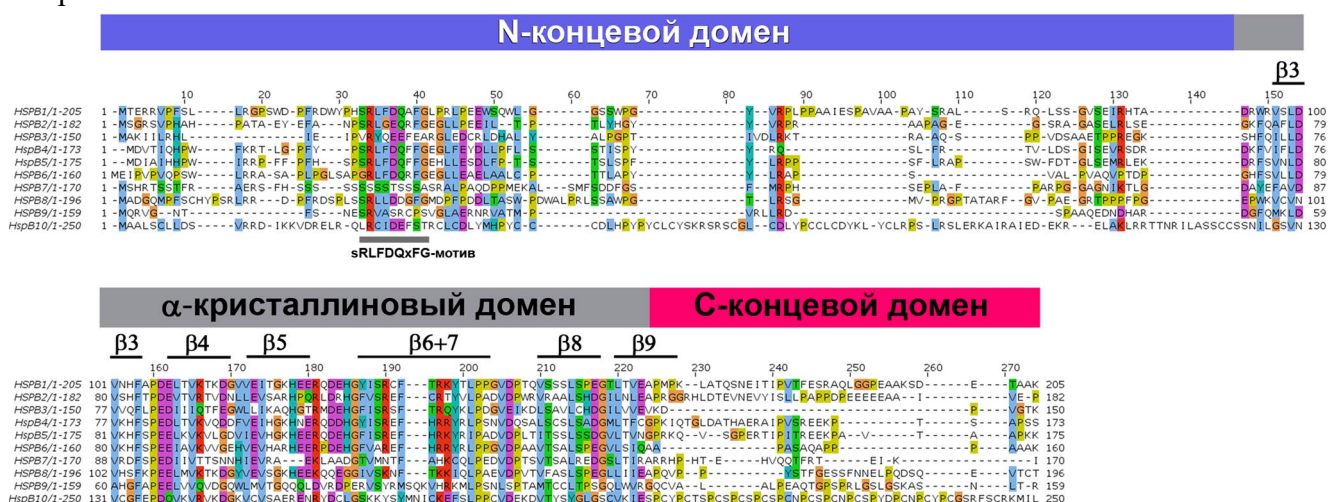


Рис. 3. Выравнивание первичных структур малых белков теплового шока человека (HSPB1-10). Синяя линия отражает границы N-концевого участка, серая линия – α-кристаллинового домена, красная линия – C-концевого участка. Положение бета-складок в α-кристаллиновом домене указано черными линиями. Положение консервативного sRLFDQxFG-мотива отмечено серной линией. Адаптировано из [1]. Множественное выравнивание выполнено с помощью программы Tcoffee (<http://tcoffee.org.cat>).

Пространственное строение N-концевого участка в значительной степени может определять структуру олигомера sHsp. В доступных моделях sHsp архей, дрожжей и растений N-концевой участок обеспечивает взаимодействие малых и средних олигомеров между собой и формирование крупного олигомерного комплекса. Важной характеристикой N-концевой последовательности является ее высокая подвижность и способность принимать множество конформационных состояний. Замечено, что только короткие участки N-концевой последовательности могут принимать стабильную вторичную структуру. Так в сферическом 24-мере MjHSP16.5 из археи *M. jannaschii* большая часть N-концевого участка лишена какой-либо

структуры и расположена в центральной полости олигомера. Лишь ближе к α -кристаллиновому домену обнаруживается короткая β -складка [25]. В структуре 24-мера StHSP14.0 из археи *S. tokodaii*, N-концевые остатки организованы аналогичным образом, однако, вместо β -складки в N-конце обнаруживается протяженная α -спираль [67]. В 12-мере HSP16.9 из пшеницы два гексамерных кольца соединены друг с другом за счет взаимодействия между α -спиралями N-концевых участков [27]. Совершенно непохожей структурой обладает мультимер SpHSP16, состоящий из 16 субъединиц. В этой бочкообразной структуре верхняя и нижняя части состоят из 4 димеров, которые скрепляются в 16-мер за счет взаимодействия 8-ми N-концевых α -спиралей в экваториальной плоскости. Остальные восемь N-концевых участков ориентированы в сторону полюсов, разупорядочены и не могут быть выявлены в кристаллической структуре [34].

Значительно меньше структурных данных об N-конце доступно для sHsp млекопитающих. Большинство доступных структур не содержат N-концевой последовательности. Большим прорывом можно считать успешную работу лаборатории Н.Н. Случанко, где впервые удалось получить кристалл полноразмерного HspB6 человека в комплексе с белком-партнером 14-3-3. Благодаря многоточечным стабилизирующим взаимодействиям в этой структуре впервые удалось проследить первые 38 остатков в N-концевой последовательности HspB6. В первую очередь в N-концевой последовательности HspB6 есть IxI подобный мотив ($^3IPVPV^7$), который по аналогии с IxI-участком в C-конце других sHsp взаимодействует с $\beta 4/\beta 8$ канавкой димера HspB6. Во-вторых, в N-конце HspB6 остаток Ser16, фосфорилированный протеинкиназой A, обеспечивает взаимодействие этого участка HspB6 с 14-3-3. Наконец, в-третьих, консервативный sRLFDQxFG мотив (27-34 остатки) контактирует с канавкой, образованной интерфейсом димеризации HspB6. В этом кристалле N-концевой участок не обладает стабильной вторичной структурой, а упорядочивается согласно правилу индуцированного соответствия, подстраиваясь под интерфейс партнера 14-3-3 [39].

Другая структура с участком N-концевой последовательности была получена при кристаллизации гетеротетрамера HspB2/HspB3. В этой структуре обе канавки, сформированные интерфейсами димеризации (между HspB2/HspB2 и HspB2/HspB3), заполнены электронной плотностью, интерпретируемой авторами, как участки N-концевых последовательностей ($^{34}LPEEILTP^{41}$) от двух мономеров HspB2 [40].

Неожиданной удачей можно считать установление структуры полноразмерного мультимера HspB1, опубликованную в 2020 году. В этой одной из наиболее подробных структур 24-мера HspB1 авторам удалось проследить более 60% остатков N-концевой последовательности каждого из мономеров. В N-концевом участке авторам удалось обнаружить лишь одну протяженную α -спираль, состоящую из остатков sRLFDQxFG мотива, в остальной части

N-концевая последовательность была упорядочена, но не имела выраженных элементов вторичной структуры [41].

В лаборатории Клевит (R.E. Klevit) методом ЯМР удалось уточнить строение N-концевого сегмента димерной формы HspB1 в растворе. В согласии с кристаллографическими данными было показано, что N-концевая последовательность димера HspB1 в растворе не обладает высокой подвижностью, характерной для свободных участков полипептидной цепи (random coil-like), а активно взаимодействует с разными участками на поверхности димера. В ходе такой временной ассоциации N-концевой сегмент приобретает квази-упорядоченное состояние (quasi ordered state). Таким образом, динамичная структура N-концевого сегмента не является хаотичной, а ее степень свободы все же ограничена некоторым набором дискретных состояний, что может частично объяснить, как sHsp формируют полидисперсные и одновременно упорядоченные олигомерные комплексы [68].

Таким образом, на основании исследований было установлено, что структура N-концевого участка не может быть описана терминами, применимыми к обычной структуре белка. На конформацию N-концевой последовательности влияет множество факторов, и она во многом зависит от локального окружения N-конца. Вероятнее всего на основании вышеперечисленных фактов можно предположить, что по мере построения все более и более крупного олигомера N-концевой участок может постепенно приобретать все более и более упорядоченное состояние. В свою очередь при взаимодействии с другими белками конформация N-концевого участка может диктоваться структурой белка-партнера.

3. Строение высокомолекулярных комплексов sHsp человека

Необычной характеристикой четвертичной структуры высокомолекулярных комплексов sHsp млекопитающих в растворе является их высокая полидисперсность. Крупные олигомеры sHsp могут включать от 12 до 40 протомеров и при этом находиться в постоянном динамическом равновесии друг с другом за счет постоянного обмена субъединицами.

Одним из наиболее исследованных малых белков теплового шока человека является HspB5 (α B-кристаллин). Расшифровка его структуры потребовала применения разнообразных методов и многолетней работы. Благодаря комбинации масс-спектрометрии, малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS), разных видов электронной микроскопии, методов химического сшивания в совокупности с разными видами ЯМР два коллектива авторов практически одновременно предложили псевдоатомные модели строения 24-х субъединичного олигомера HspB5. В обеих моделях основу олигомера HspB5 составляет тетраэдр, грани которого сложены из 4-х гексамеров (4x6). Каждый гексамер состоит из трех димеров, соединенных друг

с другом в кольцо за счет взаимодействия $\beta 4/\beta 8$ канавки α -кристаллинового домена одного димера с IxI-мотивом С-концевого участка соседнего димера (рис. 4 А). В обоих случаях все IxI-мотивы находятся в связанном с ACD состоянии. Отличия между двумя предполагаемыми моделями затрагивает в основном положение и детали строения N-концевой последовательности в 24-мере. Оба коллектива сходятся во мнении, что объединение гексамеров в мультимер происходит благодаря взаимодействию N-концевых участков [69, 54, 70, 29]. На основании моделирования по гомологии и данных твердофазного ЯМР (ssNMR) Джеле (Jehle) и соавторы [71] предсказывают наличие в N-конце двух коротких α -спиралей ($\alpha 1$ остатки 13-17; $\alpha 2$ остатки 24-36) и двух β -складок ($\beta 1$ остатки 48-51; $\beta 2$ остатки 60-63) (рис. 4 Б). Большинство остатков N-концевой последовательности остаются упорядоченными, но не входят в состав каких-либо устойчивых элементов вторичной структуры. От каждого гексамера к вершине тетраэдра отходят по две N-концевые последовательности, таким образом, мультимер формируется за счет того, что шесть N-концевых участков от трех разных гексамеров взаимодействуют друг с другом, скрепляя грани тетраэдра между собой (рис. 4 В). Часть остатков N-концевых последовательностей ориентированы внутрь мультимера и занимают пространство внутри центральной полости. Движущей силой ассоциации N-концевых участков друг с другом Джеле и соавторы [71] считают гидрофобные взаимодействия между остатками лейцина и

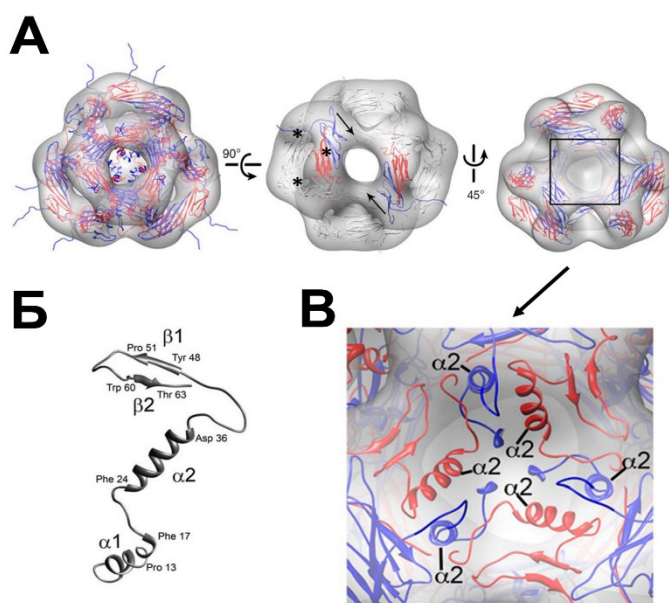


Рис. 4. Псевдоатомная модель 24-мера HspB5 (PDB ID: 3J07). **А.** Электронная плотность частицы 24-мера, показанная под разными углами. Внутри электронной плотности вписаны субъединицы HspB5, соединенные друг с другом в гексамер через взаимодействующие IxI-мотивы. В составе димера один мономер окрашен красным, другой - синим цветом. Между собой гексамеры взаимодействуют N-концевыми участками (показано стрелками на центральной структуре). Звездочками указано положение димеров. **Б.** Модель структуры N-концевого участка (остатки 1-65), сформированная на основании данных твердофазного (ssNMR) ЯМР. Элементы вторичной структуры подписаны $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\beta 1$, $\beta 2$. **В.** Увеличенное изображение области, обозначенной квадратом на правой структуре на панели А. Шесть N-концевых участков (остатки 10-39) формируют контакты между собой, объединяя три гексамера. Адаптировано из [71].

фенилаланина (Leu32, Leu33, Leu37 и Phe38) нескольких N-концевых участков. Авторы отмечают, что 24-мер составляет не более 5% от популяции олигомеров в растворе и предлагают принцип построения более крупных комплексов за счет добавления до 6 димеров к поверхности исходного олигомера [70].

Модель Браун (Braun) и соавт. [69] подтверждает все вышеописанные принципы организации олигомера (рис. 5 А), тем не менее, предсказания по длине и ориентации вторичных элементов структуры значительно отличаются от модели Джеле и соавторов. На основании данных криоэлектронной микроскопии (Стуо-ЕМ) модель Браун также предсказывает короткие α -спирали ($\alpha 2$ остатки 9-14; $\alpha 3$ остатки 21-25; $\alpha 3$ остатки 53-59) и отсутствие β -складок в N-конце (рис. 5 В). Ассоциация N-концов также в основном осуществляется за счет гидрофобных взаимодействий, при этом N-концы практически не структурированы, однако, в отличие от предыдущей модели, они локализованы на поверхности олигомера и не проникают внутрь его полости. Большим преимуществом предложенной модели является ее модульность, где увеличение размера олигомера может происходить путем присоединения мономера, димера или

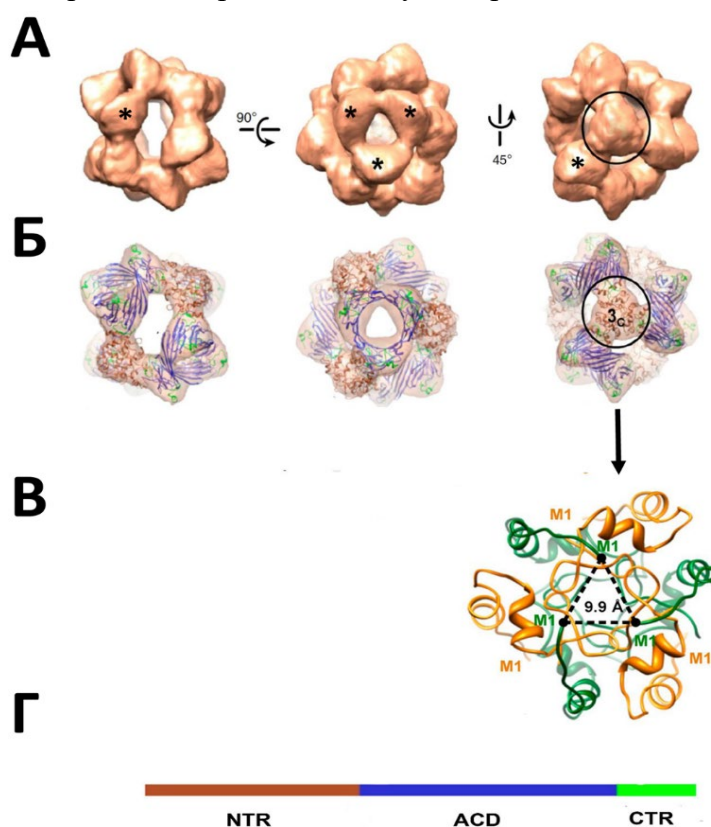


Рис. 5. Псевдоатомная модель 24-х мера HspB5 (PDB ID: 2YGD). **А.** Электронная плотность частицы 24-мера, показанная под разными углами. **Б.** Внутри электронной плотности вписаны субъединицы HspB5, соединенные друг с другом в гексамер через взаимодействующие IxI-мотивы. Между собой гексамеры взаимодействуют N-концевыми участками (отмечено черным кругом). Звездочками показано положение димеров. **В.** Увеличенное изображение области, отмеченной кругом на правой структуре на панели А. Шесть N-концевых участков формируют контакты между собой, объединяя три гексамера. M1-показывает положение первого метионина в цепи. **Г.** Доменная организация HspB5. Цветовая схема отражает элементы структуры, указанные в пункте Б. Адаптировано из [69].

гексамера. Используя подобный механизм ассоциации, авторам удалось описать практически все разнообразие частиц размером от 12 до 48 субъединиц [69].

Продолжением работы по изучению строения кристаллинов хрусталика можно считать псевдоатомную структуру HspB4 (α A-кристаллина), построенную также с применением методов Cryo-EM (рис. 6). Популяция олигомеров данного белка также сильно гетерогенна, что, однако, не помешало авторам реконструировать строение 12, 16 и 20-меров HspB4. Четвертичная структура этого белка устроена по иному принципу и представляет собой полый бочонок, стенки которого могут быть составлены из 3, 4 или 5 тетрамеров (димера димеров). Из-за низкого разрешения полученных структур достоверно определить строение концевых последовательностей не представляется возможным, тем не менее, в олигомере HspB4 роль N-

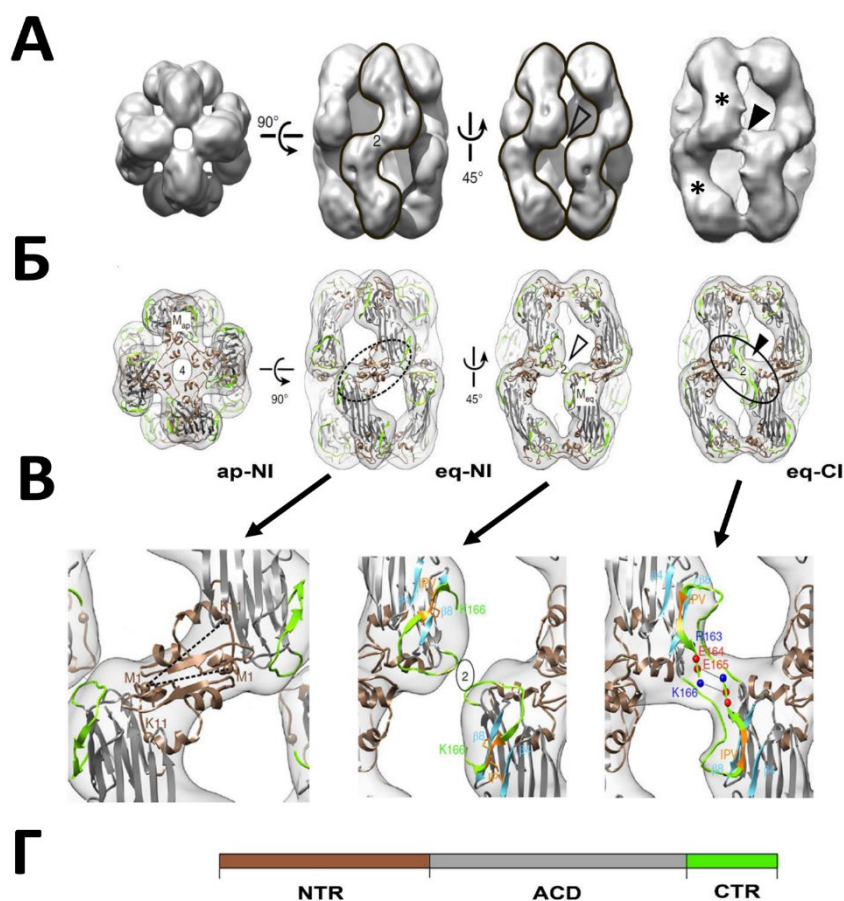


Рис. 6. Псевдоатомная модель 16-мера HspB4 (PDB ID: 6T1R). **А.** Электронная плотность частицы 16-мера, показанная под разными углами. Крайний правый рисунок показывает строение частицы с межмолекулярным контактом С-концов в экваториальной области мультимера. Звездочками отмечены положения димеров. **Б.** Модель строения мультимера HspB4. N-концевые участки формируют апикальный интерфейс взаимодействия (ap-NI) и экваториальный интерфейс (eq-NI) (отмечено пунктирным овалом). Экваториальный интерфейс взаимодействия могут формировать и С-концы (eq-CI) (черный овал). **В.** Увеличенные изображения интерфейсов взаимодействия. Левая панель – экваториальный интерфейс взаимодействия N-концевых доменов, центральная панель – структура, где интерфейс eq-CI не формируется, правая панель – взаимодействие С-концевых участков в экваториальной плоскости. **Г.** Доменная организация HspB4. Цветовая схема отражает элементы структуры, указанные на панели **Б.** Адаптировано из [72].

концевых участков представляется еще более значимой. В этой структуре авторы выделяют 2 типа контактов между N-концами димеров. В первом случае при формировании Z-образной структуры тетрамера именно N-концевые последовательности образуют интерфейс взаимодействия двух димеров в экваториальной плоскости бочонка (eq-NI) (рис. 6 Б, второй слева). Во втором случае N-концевые последовательности соединяются друг с другом в апикальных частях олигомера (ap-NI), скрепляя структуру олигомера по полюсам (рис. 6 Б, первый слева).

В отличие от структуры олигомера HspB5, N-концевые участки HspB4 способны формировать несколько видов межмолекулярных контактов. В экваториальной плоскости мультимеров может формироваться еще один интерфейс взаимодействия, возникающий за счет взаимного обмена IxI-мотивами C-концевых участков двух соседних экваториальных мономеров (eq-CI). Этот тип контактов детектируется приблизительно в 20% случаев (рис. 6 Б, последний справа; рис. 6 В, последний справа), а в остальных мономерах IxI-мотивы связываются с $\beta 4/\beta 8$ канавками собственных димеров (рис. 6 Б, предпоследний справа; рис. 6 В, средний) [72].

Таким образом анализ полученных псевдоатомных моделей указывает на то, что структура N-конца высоко подвижна и структурируется по мере укрупнения размера олигомера, а конкретное строение N-конца зависит от его локального окружения. N-концевые участки ассоциируют друг с другом за счет множественных слабых контактов, имеющих в основном гидрофобную природу.

4. Роль N-концевого участка в регуляции олигомерного состояния и шапероноподобной активности sHsp

Динамичная четвертичная структура sHsp предполагает одновременное сосуществование в растворе множества олигомерных форм. В клетке олигомерное состояние sHsp активно регулируется за счет введения пост-трансляционных модификаций. Одной из важнейших модификаций является фосфорилирование N-концевого участка. При неблагоприятных воздействиях, таких как тепловой шок или окислительный стресс, в клетках происходит фосфорилирование некоторых sHsp [73, 74]. У человека фосфорилирование HspB1 осуществляется по остаткам Ser15, Ser78 и Ser82 [75], HspB5 - по остаткам Ser19, Ser45, Ser59 [76], HspB6 - по остаткам Ser16 и Ser59, а HspB8 по Ser27, Ser57, Ser87 и др. [19] (рис. 7).

Как правило, фосфорилирование приводит к диссоциации и уменьшению размеров крупных олигомеров [77, 78]. Роль малых олигомеров sHsp в предотвращении агрегации белков остается предметом дискуссии, и на сегодняшний день в литературе до сих пор нет единого

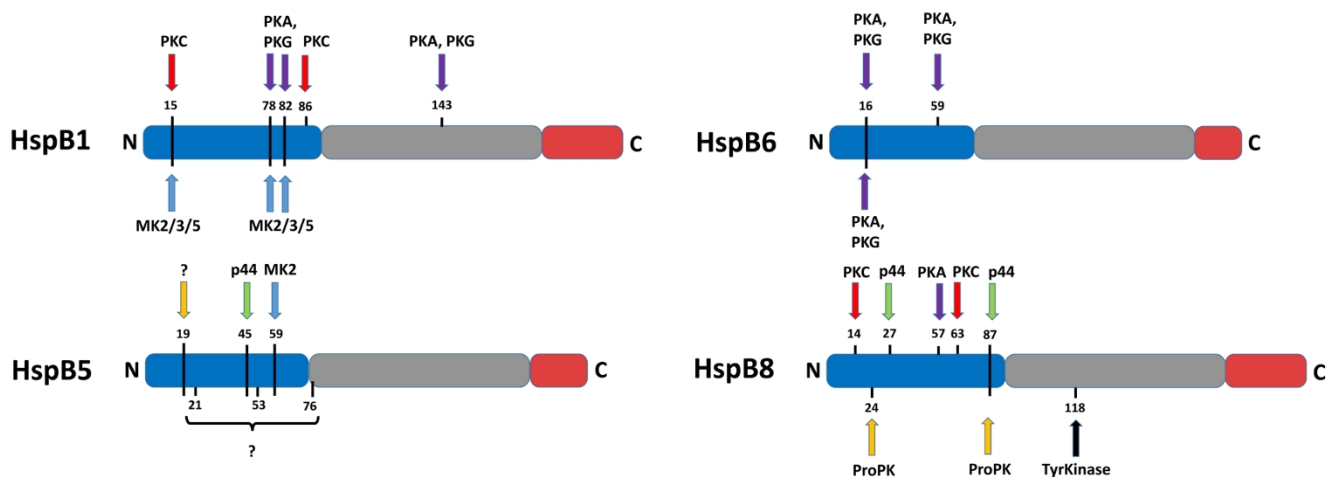


Рис. 7. Схема расположения участков фосфорилирования в структуре малых белков теплового шока HspB1, HspB5, HspB6 и HspB8. Синим, серым и красным прямоугольниками обозначены N-концевой участок, α -кристаллиновый домен и С-концевой участок соответственно. Разноцветными стрелками и подписями сверху указаны протеинкиназы, осуществляющие фосфорилирование *in vitro*; снизу под схемами указаны участки фосфорилирования и протеинкиназы, участвующие в фосфорилировании *in vivo*. PKA - протеинкиназа А, PKG – протеинкиназа G, PKC - протеинкиназа C, p44 – киназа ERK1, ProPK – пролин направленная протеинкиназа, TyrKinase – тирозин специфичная протеинкиназа, MK2/3/5 – киназы MAPK каскада. Знаками вопроса помечены участки фосфорилирования, для которых точно не установлены протеинкиназы, участвующие в фосфорилировании. Номера участков фосфорилирования указаны для белков человека.

мнения о том, какие из олигомерных форм (крупные или малые олигомеры) sHsp более активны и эффективны. Изучение пространственного строения sHsp показывает, что гидрофобные участки в крупных олигомерах скрыты и находятся в недоступной форме, что позволяет сформулировать предположение о том, что крупные олигомеры sHsp являются резервуарами, сохраняющими малые олигомеры в неактивной форме до наступления стрессовых условий [69, 78]. Фосфорилирование остатков серина в N-концевой последовательности приводит к диссоциации олигомеров, экспонированию гидрофобных областей и, как следствие, активации шапероно-подобных свойств малых белков теплового шока [78, 50, 79, 80]. Эта гипотеза не лишена недостатков, и критика этой гипотезы может состоять в следующем. Во-первых, большинство работ по изучению влияния фосфорилирования на строение и свойства малых белков теплового шока было выполнено на фосфоимитирующих мутантах этих белков, где остаток серина заменялся на остаток аспарагиновой (или глутаминовой) кислоты, который по химическим свойствам лишь отдаленно похож на остаток фосфосерина. Во-вторых, фосфорилирование или псевдофосфорилирование не всегда приводит к активации шапероноподобных свойств sHsp [77, 81, 82, 83, 84]. В-третьих, несмотря на то, что фосфорилирование малых белков теплового шока *in vivo* не вызывает сомнения, до сих пор достоверно не определена степень фосфорилирования анализируемых белков в клетке [85]. В четвертых, некоторые малые белки теплового шока (HspB2, HspB3, HspB6, HspB8) не образуют крупных олигомеров и согласно предложенной логике должны проявлять наибольшую шапероноподобную активность, что не согласуется с экспериментальными фактами [21].

Альтернативная гипотеза предполагает, что наиболее активными шаперонами являются наоборот крупные олигомеры [86, 87, 88, 89] или же, что при связывании с белками субстратами малые олигомеры могут вновь собираться в крупный олигомер и уже в такой форме осуществлять передачу денатурированных белков в систему рефолдинга белка [20].

Механизмы реализации шапероноподобной активности малыми белками теплового шока остаются мало изученными и теоретически недостаточно разработанными. Попытки определить центры связывания белков-субстратов в структуре sHsp методами пептидного картирования [90, 91, 92], делеционного анализа [66, 47, 93, 94], точечного мутагенеза [63, 48, 80, 95, 52, 18, 96, 97] и создания химерных белков [98, 99, 100], показали, что а) в первичной структуре sHsp нет четко определенных участков, напрямую отвечающих за шапероноподобную активность; б) разные белки-субстраты связываются с разными участками в первичной структуре sHsp; в) вероятнее всего, в клетке присутствует функциональная специализация между паралогами sHsp [21]; г) связывание субстрата во многом зависит от типа его агрегации (аморфная, амилоидная и др.) [42, 101, 20].

5. Гетероолигомерные комплексы малых белков теплового шока

Во многих геномах живых организмов можно обнаружить сразу несколько генов sHsp, кодирующих разных представителей этого семейства белков. Продукты этих генов часто коэкспрессируются в одних и тех же тканях и могут формировать не только гомоолигомерные, но и гетероолигомерные комплексы. Гетероолигомеризация не всегда протекает одинаково эффективно. Например, в цитоплазме растительных клеток одновременно сосуществуют два класса родственных sHsp, не формирующих гетероолигомеры [102, 59]. Малые белки теплового шока человека напротив достаточно активно образуют гетерокомплексы друг с другом (рис. 8). В связи с трудностями изучения четвертичной структуры гомоолигомеров sHsp гетероолигомерные комплексы исследованы в еще меньшей степени. Высказываются предположения, что гетероолигомеризация может регулировать шапероноподобную активность и изменять субстратную специфичность sHsp [103, 104]. При исследовании гетерокомплексов важно учитывать несколько ключевых факторов. Во-первых, многие sHsp экспрессируются тканеспецифично, что ограничивает возможность их взаимной гетероолигомеризации в клетке (Таблица 2) [22]. Во-вторых, даже при совместной коэкспрессии нескольких представителей семейства sHsp в одной ткани концентрация разных малых белков теплового шока может сильно различаться [105]. В-третьих, если гетерокомплекс формируется, то определить его четвертичную структуру оказывается технически очень затруднительным. Для некоторых sHsp необходимым

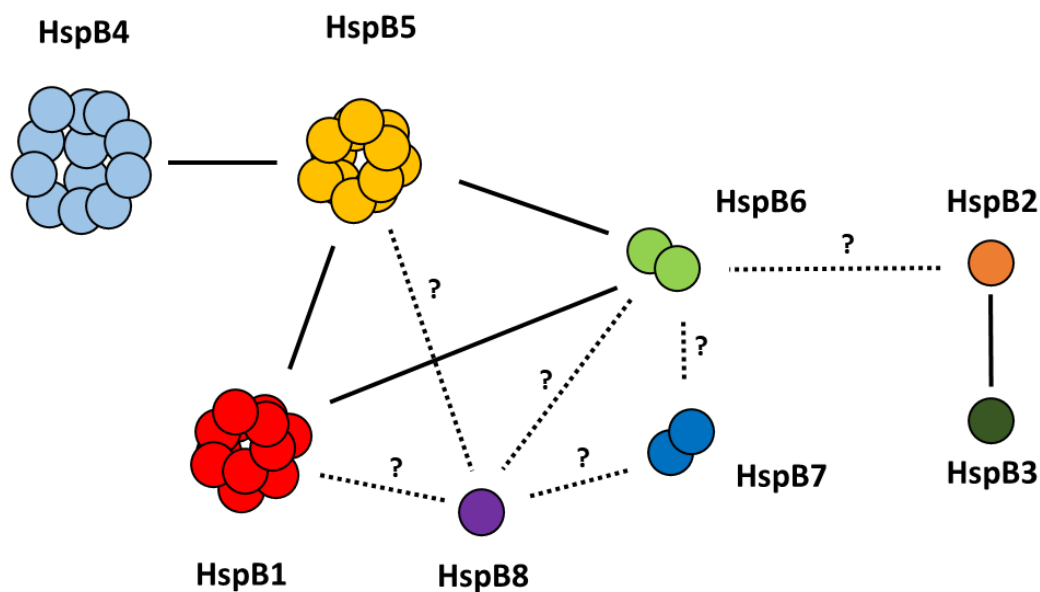


Рис. 8. Схема взаимодействия различных sHsp при условии, что указанные белки коэкспрессируются в одной ткани. Взаимодействия между sHsp могут зависеть от типа ткани, физиологического статуса клетки и степени фосфорилирования sHsp. Черными сплошными линиями показаны взаимодействия, достоверно установленными как *in vitro*, так и *in vivo*. Пунктирными линиями и знаками вопроса отмечены взаимодействия, детектированные косвенными методами (дрожжевой двугибридный скрининг, коиммунопреципитация). Адаптировано из [103].

условием гетероолигомеризации является образование мономеров. Однако, возможны варианты, при которых гетероолигомеры образуются путем обмена не мономерами, а димерами малых белков теплового шока [106].

Один из первых гетерокомплексов sHsp был описан при выделении белков хрусталика глаза. В ходе дифференциации клеток хрусталика в них происходит одновременный синтез HspB5 (α B-кристаллина) и HspB4 (α A-кристаллина). Эти белки взаимодействуют друг с другом с образованием гетерокомплекса (α -кристаллина), в котором, как правило, соотношение α A- и α B-кристаллинов близко к 3:1. Следует отметить, что в ходе онтогенеза это соотношение может изменяться. Образовавшийся гетероолигомерный комплекс участвует в поддержании на необходимом уровне рефрактерного индекса хрусталика. В отсутствие мочевины этот комплекс не удастся разделить на два гомоолигомера, что свидетельствует о наличии прочного взаимодействия между белками [107]. Методами электронной микроскопии удалось установить, что нативный α -кристаллин представлен в виде полидисперсных эллипсоидных частиц с молекулярной массой в интервале от 300 кДа до 1 МДа [108, 107]. Отсутствие структуры с высоким разрешением не позволяет подробно исследовать строение этого гетерокомплекса, тем не менее, обширные исследования α -кристаллинов, сформированных мутантными формами HspB4 или HspB5, позволяют заключить, что как и в случае с гомоолигомерными комплексами, N-концевые контакты оказывают существенное влияние на формирование и свойства гетероолигомерного α -кристаллина [109, 110, 36, 111]. В экспериментах по химическому

сшиванию с последующим анализом методами масс-спектрометрии удалось обнаружить, что N-концевые участки субъединиц HspB4 и HspB5 образуют как гомо-, так и гетероолигомерные контакты. Любопытно, что субъединицы HspB5 диссоциируют из гетероолигомерного комплекса значительно легче, чем субъединицы HspB4, что может свидетельствовать о возможном неоднородном строении гетероолигомерного кристаллинового комплекса [112, 107].

Другим примером гетероолигомеризации служит комплекс HspB2/HspB3, формирующий в мышечной клетке тетрамер в строгом соотношении 3:1. Два димера объединяются в тетрамер в основном за счет обоюдного взаимодействия их C-концевых участков, где IxI-мотив одного димера присоединен к $\beta 4/\beta 8$ канавке ACD второго димера. N-концевые участки в этом случае выполняют стабилизирующую роль [40].

HspB5 присутствует не только в хрусталике глаза, но и в мышечной ткани, где вместе с ним в высокой концентрации экспрессируются HspB1 и HspB6. Эти три белка соочищаются друг с другом [113, 114, 115] и попарно формируют гетероолигомерные комплексы [106, 116]. Изолированные HspB1 и HspB5 в растворе находятся в виде крупных олигомеров и при их смешивании также формируется крупный гетероолигомер [104, 116]. Шапероноподобная активность комплекса HspB1/HspB5 меньше аналогичной активности изолированных белков [104], хотя и не для всех субстратов [116]. Свойства гетерокомплекса HspB1/HspB5 хорошо согласуются с предположением о резервуарной роли крупных олигомеров, в которых шапероноподобные свойства субъединиц находятся в ингибированном состоянии. Действительно, активация входящих в комплекс субъединиц может происходить при воздействии на клетку теплового шока, при котором происходит фосфорилирование HspB1, вследствие чего происходит диссоциация комплекса HspB1/HspB5 [115].

HspB6 преимущественно представлен в растворе в виде димеров, которые способны к временной ассоциации друг с другом [117]. HspB6 взаимодействует с HspB1 и HspB5, индуцируя диссоциацию крупных олигомеров этих белков и формирование меньших по размеру гетероолигомерных комплексов [105, 106].

Комплекс HspB1/HspB6 представлен полидисперсной популяцией гетероолигомеров. На уровне субъединиц гетероолигомер составлен из гетеродимеров, причем замещение части мономеров HspB1 на HspB6 в комплексе значительно сказывается на стабильности четвертичной структуры [118], что, вероятно, влияет на увеличение шапероноподобной активности гетерокомплекса, хотя и не для всех типов субстратов [104]. На основании анализа панелей делеционных и точечных мутантов, исследованных в лаборатории профессора С. В. Стрелкова, была сформулирована гипотеза о том, что N-концевые последовательности HspB1 и HspB6 играют разную роль при построении гетерокомплекса. Общая стабильность комплекса

определяется N-концевыми участками HspB1, а N-концевые участки HspB6 оказывают дестабилизирующее воздействие на четвертичную структуру гетерокомплекса, что, вероятно, является необходимым условием для внедрения субъединиц в состав гетероолигомера. Делеционное картирование позволило установить, что ключевой участок, обеспечивающий гетероолигомеризацию как в случае HspB6, так и в случае HspB1 содержит консервативный sRLFDQxFG мотив [119].

В отличие от гетероолигомера HspB1/HspB6 четвертичная структура комплекса HspB5/HspB6 близка по молекулярной массе к изолированному HspB5, а сам гетерокомплекс значительно более стабилен. В составе гетероолигомера HspB5/HspB6 количество субъединиц HspB5 превышает количество субъединиц HspB6 приблизительно в 2 раза [106]. Образование менее крупных частиц также активирует шапероноподобную активность гетерокомплекса, причем даже сильнее, чем в случае с HspB1/HspB6 [104]. Формирование комплекса происходит в несколько этапов. Согласно модели, предложенной Клевит (R. E. Klevit) и соавторами, встраивание субъединиц HspB6 в состав олигомера HspB5 начинается с взаимодействия C-концевого участка HspB5 с $\beta 4/\beta 8$ канавкой ACD HspB6. Далее происходит гетероолигомеризация на уровне формирования гетеродимера². На последнем этапе происходит взаимодействие N-концевых последовательностей HspB5 и HspB6 [61].

Возможность формирования гетерокомплексов между другими малыми белками теплового шока человека до сих пор остается мало изученной. Малый белок теплового шока HspB8 активно экспрессируется во многих тканях, где также представлены и другие sHsp. Методами иммуноблоттинга и дрожжевого двугибридного анализа было установлено, что HspB8 может взаимодействовать практически со всеми малыми белками теплового шока человека [120, 121, 122]. Это утверждение однако не получило подтверждения в опытах *in vitro* [123, 106]. Ещё один представитель семейства малых белков теплового шока, HspB7 экспрессируется только в инсулин-зависимых тканях (скелетная и сердечная мышца, жировая ткань), где также представлены многие другие sHsp [124, 22]. Косвенными методами удается детектировать возможное образование гетерокомплексов этого белка с HspB6 и HspB8, однако достоверные данные о существовании *in vivo* гетероолигомеров HspB7 отсутствуют [125, 120]. Можно высказать два предположения, объясняющих затруднения в выявлении гетерокомплексов HspB7 и HspB8. Первое объяснение базируется на том, что в тканях концентрация как HspB7, так и HspB8 достаточно мала, что значительно снижает вероятность их включения в какой-либо гетерокомплекс. Второе положение основывается на необычной структуре этих белков.

² Стоит, однако, отдельно отметить, что на сегодняшний день в литературе отсутствуют достоверные сведения о существовании гетеродимеров, сформированных этими двумя белками.

Действительно, первичная структура HspB7 и в особенности структура его N-конца значительно отличается от всех других sHsp (рис. 3), что может затруднять его включение в гетерокомплексы [124]. В дополнение к этому физико-химическая характеристика третичной структуры HspB8 показывает ее общую нестабильность [126]. Таким образом, вопрос существования гетерокомплексов этих белков *in vitro* и *in vivo* требует дальнейшего более тщательного исследования.

6. Взаимодействие малых белков теплового шока с белками-партнерами

Функция малых белков теплового шока в клетке не ограничивается только взаимодействием с частично или полностью денатурированными белками (белками-субстратами), но согласно растущему числу публикаций последних лет они также активно взаимодействуют со многими белками-партнерами при нормальных физиологических условиях [1, 29, 127, 46]. Среди основных белков-партнеров малых белков теплового шока выделяют универсальный адаптерный белок 14-3-3 [127, 39] и мультифункциональный адаптерный белок BAG3 [128, 129]. Взаимодействие sHsp с белками-партнёрами, в отличие от взаимодействия с белками-субстратами, можно описать в рамках общепринятых принципов белок-белковых взаимодействий.

6.1. Комплекс HspB6 с белком 14-3-3

Одним из основных партнеров HspB6 в клетках гладкой мускулатуры является белок 14-3-3. Активация cAMP- или cGMP-зависимых протеинкиназ в гладкой мускулатуре приводит к фосфорилированию HspB6, что коррелирует с расслаблением мышцы [19]. Известно, что фосфорилирование HspB6 происходит по остатку Ser16, а участок ¹³RRApSAP¹⁸ в первичной структуре HspB6 является каноническим мотивом узнавания для белка 14-3-3 [19, 127]. Этот универсальный адаптерный белок составляет значимую долю от всех растворимых белков клетки и принимает участие во многих клеточных процессах, таких как регуляция структуры, стабильности, локализации и активности внутриклеточных белков и др. В клетке одновременно может экспрессироваться до 7 изоформ 14-3-3, формирующих гомо- и гетеродимеры [130]. Димеры 14-3-3 связывают последовательности, содержащие фосфосерин или фосфотреонин, однако, не исключена возможность взаимодействия 14-3-3 и с нефосфорилированными партнерами [131]. При связывании фосфоформы HspB6 с 14-3-3 формируется гетеротетрамерный комплекс, состоящий из димера 14-3-3 и димера HspB6 [127, 39]. Для объяснения участия HspB6 или комплекса HspB6/14-3-3 в мышечном расслаблении было сформулировано несколько

гипотез, однако до сих пор молекулярные механизмы этого процесса остаются невыясненными [19].

Строение комплекса 14-3-3 с фосфорилированным HspB6 было подробно изучено Н.Н. Случанко и соавторами [39]. Высказывается предположение, что фосфорилированный димер HspB6 взаимодействует с 14-3-3 в несколько этапов (рис. 9). Сначала фосфорилированный пептид HspB6, содержащий Ser16, связывается с бороздкой, узнающей фосфат на поверхности одной из субъединиц 14-3-3 (pS16 на рис. 9 А, Б). Далее происходит посадка димера HspB6 на боковую поверхность 14-3-3 (рис. 9 А, Б), после чего результирующий комплекс стабилизируется за счет взаимодействия $^3IPVPV^7$ мотива в N-концевом участке HspB6 с гидрофобной боковой канавкой α -кристаллинового домена (черная рамка на рис. 9 А и рис. 9 В). Важно отметить, что в процессе формирования комплекса происходит структуризация и других участков N-концевого региона HspB6. Так консервативный SRLFDQxFG мотив (27-34 остатка) контактирует с канавкой, образованной интерфейсом димеризации HspB6, за счет взаимодействия отрицательно заряженного D30 с положительными остатками аминокислот в глубине интерфейса димеризации (рис. 9 Б, Г, Д). N-концевой участок упорядочивается согласно правилу индуцированного соответствия, подстраиваясь под интерфейс партнера 14-3-3.

Фосфорилирование HspB6 может происходить не только в ходе регуляции сократительной деятельности гладкой мышцы, но и во многих других процессах. Так исследования, проведенные в лаборатории доктора Е. Краниас (Е. Kranias), показали, что HspB6 и его фосфорилированная форма выполняют кардиопротекторную функцию и защищают сердечную ткань от окислительного стресса в ходе ишемии/реперфузии и инфаркта. Сердца трансгенных мышей, экспрессирующие HspB6 с заменой S16A (неспособен фосфорилироваться), хуже восстанавливаются после инфаркта; в них развиваются большие очаги некроза и нарушается аутофагия по сравнению с обычными сердцами [132]. Кроме того, оказалось, что кардиопротекторная функция HspB6 может нарушаться и в случае мутаций S10F и P20L, локализованных в непосредственной близости от участка фосфорилирования [133, 134, 135]. Согласно данным лаборатории Е. Краниас мутация S10F снижает защитную функцию HspB6 за счет нарушения его взаимодействия с белком Beclin 1 [134], регулирующим процесс аутофагии, в то время, как мутация P20L приводит к снижению степени фосфорилирования HspB6 и нарушению его функции при ишемии [135]. Можно предположить, что замены S10F и P20L могут также влиять и на взаимодействие фосфорилированного HspB6 с белком 14-3-3. Известно, что для связывания фосфосерина бороздкой на поверхности 14-3-3 необходимо также наличие специального аминокислотного контекста, упрочняющего взаимодействие двух белков [130].

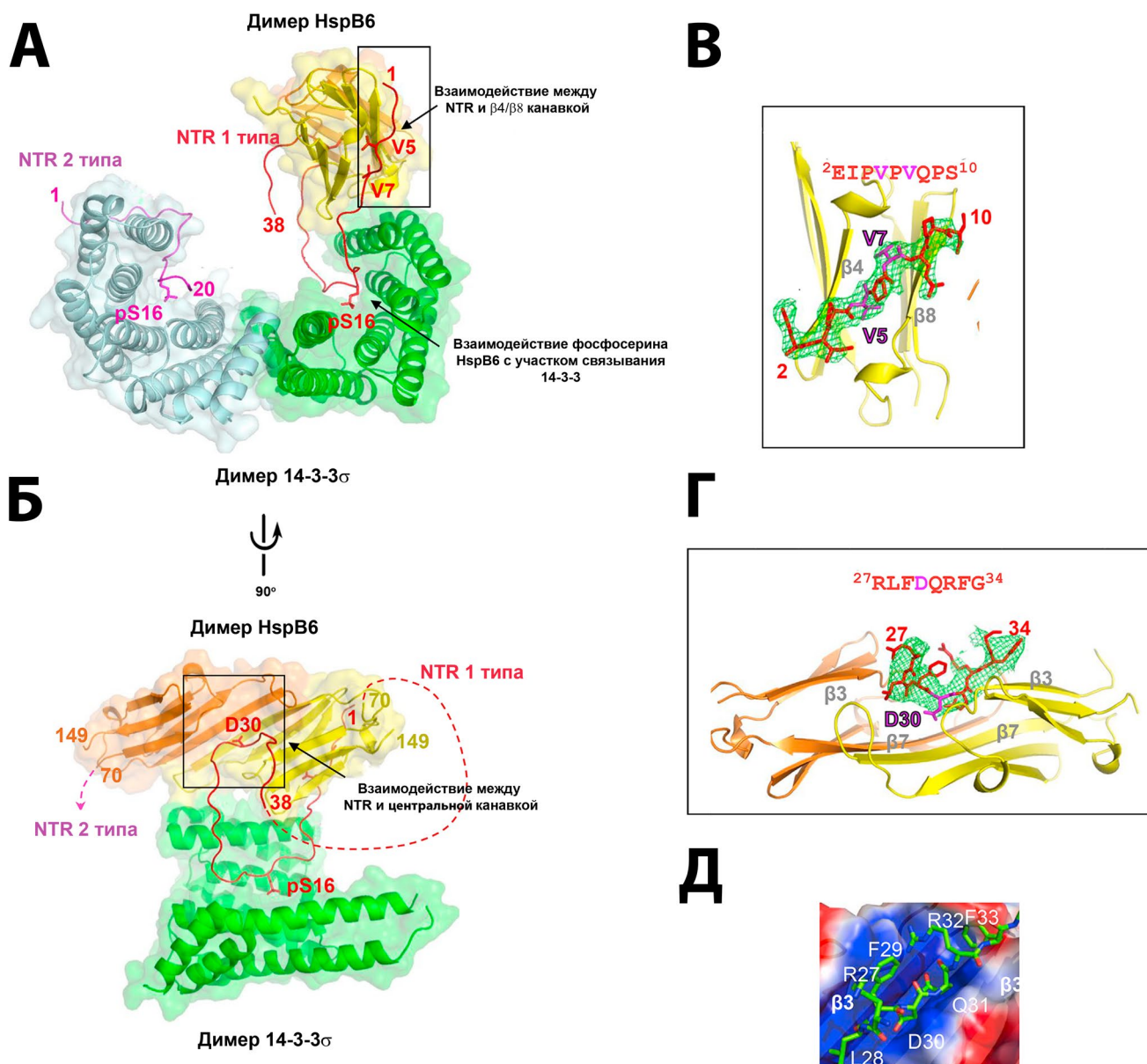


Рис. 9. На панелях **А** и **Б** изображены две проекции кристаллической структуры гетеротетрамерного комплекса 14-3-3 σ /HspB6-P (мономеры 14-3-3 обозначены светло-голубым и зеленым цветом, мономеры HspB6 выделены желтым и оранжевым цветом) (PDB: 5LTW). N-концевые участки HspB6 (NTR) двух типов (NTR 1 и NTR 2) выделены красным и розовым цветом, соответственно. NTR 1 типа формирует внутримолекулярный контакт, в то время, как NTR 2 типа формирует контакт с комплексом по соседству в кристаллической решетке. Участки NTR, непрослеживаемые в кристаллической структуре, обозначены прерывистой линией. Наиболее важные остатки аминокислот выделены и помечены. Панель **В** детальнее раскрывает внутримолекулярное взаимодействие (черный квадрат на панели **А**) пептида ${}^2\text{EIPVPVQPS}^{10}$ N-конца с $\beta 4/\beta 8$ канавкой ACD HspB6. Зеленой сеткой указана электронная плотность пептида при 2.6Å и 2.5 σ . На панели **Г** детализировано взаимодействие (черный квадрат на панели **Б**) между пептидом ${}^{27}\text{RLFDQRF}^{34}$ N-конца с центральной канавкой ACD HspB6. Зеленой сеткой указана электронная плотность пептида при 4.5Å и 2.5 σ . Фиолетовым указаны аминокислоты, принимающие участие в молекулярных контактах. Электростатический потенциал от -1 (красный) до +1 (синий) центральной канавки ACD HspB6 указан на панели **Д**. Адаптировано из [39].

Нарушение этого контекста, может ослаблять связывание с 14-3-3, что также может приводить к вышеуказанным процессам.

6.2. Взаимодействие sHsp с белком-адаптером BAG3

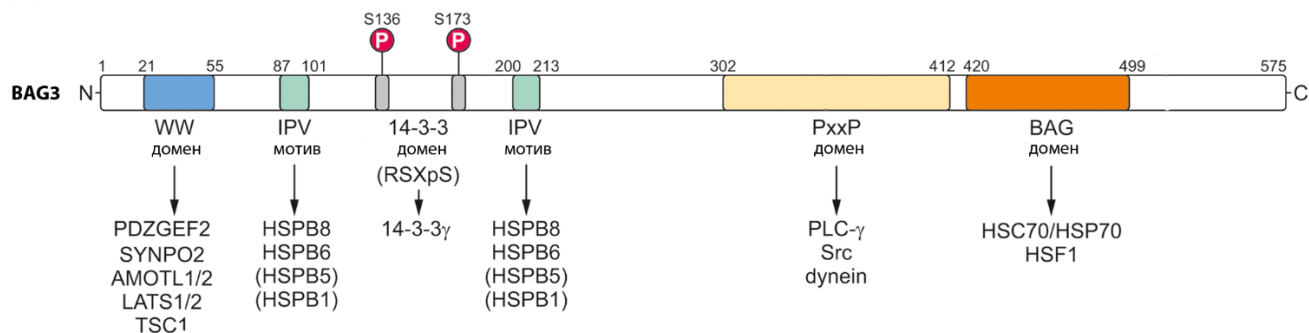
Система протеостаза клетки является тонко организованной сетью белков, контролирующую пространственную структуру белков-клиентов на каждом этапе «жизненного цикла» полипептидной цепи. Практически все белки клетки даже при нормальных физиологических условиях находятся в состоянии постоянного обмена и замещения вновь синтезированными копиями³. Время жизни белковых молекул в клетке может значительно различаться. В неделящихся клетках время жизни полипептидных цепей может составлять от 10 до 1000 часов [136], а в физиологически активных тканях, например, в мышце период замещения половины всех белков, составляющих основу саркомера, происходит в течение 3-10 дней [137]. Контроль за пространственной структурой белка происходит на каждом из этапов его жизненного цикла. Шапероны контролируют фолдинг вновь синтезируемой белковой молекулы, а при нарушении трехмерной структуры белка шапероны участвуют в рефолдинге частично денатурированной полипептидной цепи или при ее агрегации осуществляют разборку агрегатов и последующий рефолдинг. Если рефолдинг полипептидной цепи оказывается невозможным в силу повреждений ее структуры или необратимости агрегации, тогда в системе протеостаза клетки запускаются процессы по разрушению такой полипептидной цепи или их агрегатов. Принципиально существуют две взаимодополняющих системы, обеспечивающие элиминацию необратимо денатурированных белков. Это система деградации белков в протеасоме и система разрушения крупных белков, агрегатов или органелл в аутофагосоме [2, 11, 129, 138, 139, 12].

Баланс между процессами протеасомной и аутофаголизосомной деградации определяется семейством белков BAG. В геноме человека встречается 6 представителей этого семейства, характеризующихся наличием BAG-домена, который обуславливает связывание этих белков с АТР-зависимым шапероном Hsp70. Некоторые из BAG белков выступают в роли партнеров, активирующих обмен нуклеотидов в активном центре Hsp70, что способствует высвобождению белка-субстрата из активного центра Hsp70 [9]. Кроме того, белки семейства BAG выступают также в роли адаптеров или платформ для сборки компонентов системы рефолдинга или деградации белков. Так в первичной структуре BAG1 обнаруживается убиквитин-подобный домен, который позволяет этому белку связываться с протеасомой, привлекая таким образом комплекс Hsp70/Hsp40/белок-клиент к протеасоме для последующей деградации. BAG3 в свою очередь содержит RxxP домен (рис. 10 А), обеспечивающий его взаимодействие с компонентами цитоскелета и аутофагосомы [15]. Согласно современным представлениям направление

³ Белки хрусталика глаза составляют редкое исключение, будучи синтезированными на первых этапах онтогенеза, они практически не подвергаются обновлению и замещению новыми белками и остаются в хрусталике на протяжении всей жизни.

деградации денатурированного белка в клетке по протеасомному или аутофагосомному пути определяется балансом между белками BAG1 и BAG3. В физиологических условиях в клетках превалирует BAG1, а BAG3 слабо экспрессируется, что обеспечивает преимущественное разрушение белков по протеасомному пути. При сильном стрессе протеасома оказывается перегруженной и экспрессия BAG3 возрастает, что активирует процессы аутофагии в клетке [129].

А



Б

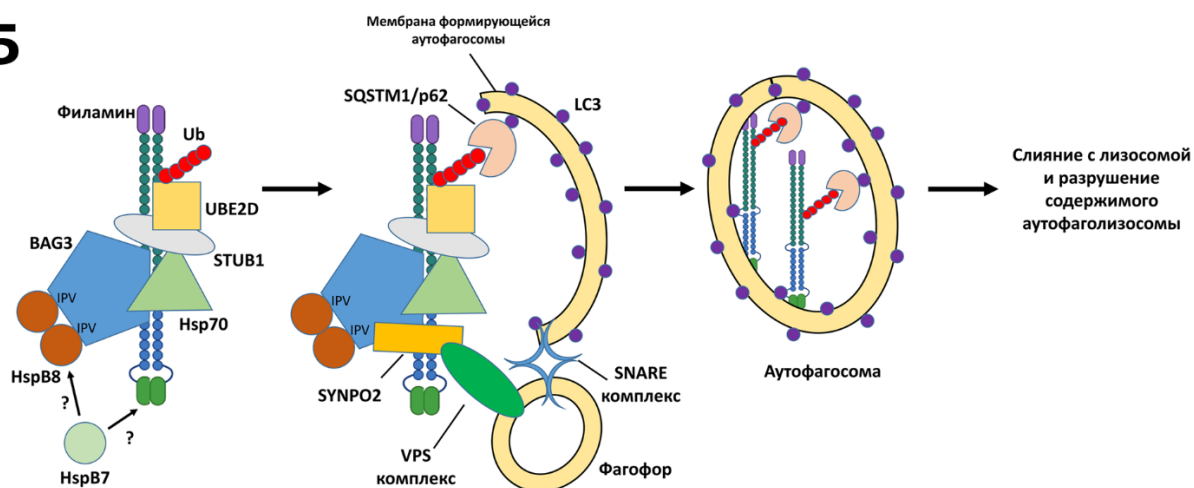


Рис. 10. А. Схема строения первичной структуры белка BAG3. WW-домен отвечает за взаимодействие с пролин богатыми повторами, которые содержатся в указанных на схеме белках; IPV-мотивы (IxI-мотивы) обеспечивают связывание разными sHsp; положения S136 и S173 могут подвергаться фосфорилированию и взаимодействовать с 14-3-3; PxxP домен обеспечивает связывание с белками, содержащими SH3 домен; BAG домен связывается с Hsp70 и HSF1. Адаптировано из [129]. **Б.** Схема участия BAG3 в процессе разрушения филамина в аутофагосоме. Филамин разрушается под действием мульти шаперонного комплекса, формирующегося на основе белка-адаптера BAG3. Несколько центров связывания (на схеме указаны, как IPV) позволяют BAG3 привлекать субъединицы HspB8 и возможно других sHsp, а другой участок BAG3 (BAG-домен) связывается с АТФ-зависимым шапероном Hsp70. Белковый комплекс, собранный на платформе BAG3, участвует в индукции процесса шаперон-опосредованной избирательной аутофагии (CASA). В дальнейшем такой тройной комплекс способен привлекать убиквитиновые конъюгирующие ферменты STUB1 и UBE2D для добавления убиквитиновой метки (Ub) к филамину. Взаимодействие убиквитина с примембранным комплексом, состоящим из белков LC3 и SQSTM1/p62, привлекает филамин в формирующуюся аутофагосому. Рост аутофагосомы происходит за счет привлечения к белковому комплексу мембран фагофоров комплексом SYNPO2 и VPS, взаимодействующих с платформой BAG3 через WW-домен, а их слияние с мембраной, формирующейся аутофагосомы, обеспечивается белковым комплексом SNARE. Разрушение белков-субстратов происходит после слияния аутофагосомы с лизосомой. Адаптировано из [149].

Среди sHsp в процессе аутофагии наиболее изучено участие белка HspB8, который в составе тройного комплекса HspB8/BAG3/Hsp70 (рис. 10 Б), участвует в инициации зависящей от шаперонов избирательной аутофагии (CASA). Связывание между BAG3 и HspB8 осуществляется за счет двух IxI-подобных мотивов в первичной структуре BAG3 (рис. 10 А), которые могут взаимодействовать с $\beta 4/\beta 8$ канавкой мономера HspB8 [128, 46]. Стехиометрия комплекса BAG3:HspB8 вероятнее всего составляет 1:2, так как оба IxI мотива BAG3 принимают участие в связывании HspB8 [46, 140]. Пространственная структура, как BAG3, так и HspB8 содержит протяженные участки внутренней разупорядоченности [53, 141], которые могут структурироваться при формировании комплекса между этими белками [142]. Экспериментальные данные об взаимодействии с BAG3 были также получены для HspB1 [140], HspB2 [143], HspB5 [144, 143, 140], HspB6 [140, 46, 142]. Тем не менее, на данный момент достоверной информации об участии иных малых белков теплового шока, кроме HspB8, в образовании комплекса с Bag3 в клетке пока не получено. Представленные в литературе данные свидетельствуют в пользу того, что связывание BAG3 с α -кристаллиновым доменом HspB8 происходит с наибольшим сродством, что вероятнее всего делает HspB8 основным партнером BAG3 в клетке. Также высказываются предположения, что связывание некоторых sHsp с BAG3 затруднено. Это обусловлено тем, что в случае HspB1 и HspB5 их $\beta 4/\beta 8$ канавки в составе крупных олигомеров уже оккупированы IxI мотивами соседних субъединиц, что блокирует связывание IxI мотивов BAG3. Это предположение находит подтверждение при исследовании природных точечных мутаций в IxI мотиве HspB1. Действительно, мутантная форма HspB1 P182L эффективнее взаимодействует с BAG3, что может нарушать нормальное функционирование CASA комплекса в клетке и приводить к развитию болезни Шарко-Мари-Тута [145]. С BAG3 в некоторых тканях также совместно экспрессируется HspB7. Метод иммунопреципитации не позволил выявить взаимодействие между HspB7 и BAG3 [146, 147, 148]. Однако нельзя исключить того, что HspB7 может каким-то косвенным образом участвовать в функционировании тройного комплекса HspB8/BAG3/Hsp70. Так, например, известно, что тройной комплекс участвует в деградации крупного структурного мышечного белка филамина С по аутофагосомному пути (рис. 10 Б) [149]. При этом некоторые экспериментальные данные свидетельствуют о том, что филамин также может взаимодействовать с HspB7 [150, 151]. Можно высказать предположение, что HspB7 не взаимодействует с BAG3, однако действует сообща с комплексом HspB8/BAG3/Hsp70 при деградации филамина С (рис. 10 Б). С другой стороны, нельзя исключать возможность взаимодействия HspB7 и HspB8 друг с другом [120], что также может привлекать HspB7 в тройной комплекс при протеолитической деградации филамина С (рис. 10 Б).

В геноме человека обнаружено 10 генов малых белков теплового шока, причем каждый представитель семейства содержит свой уникальный по первичной структуре N-концевой домен. В его вариабельной структуре тем не менее обнаруживается небольшой полуконсервативный мотив, который принято обозначать как sRLFDQxFG-мотив. Этот участок встречается не у всех представителей и отсутствует в структуре HspB7, HspB9 и HspB10. Объяснить сохранение небольшой группы аминокислот в общем вариабельном контексте можно либо его важностью для поддержания структуры белка, либо выполнением этим мотивом каких-либо функций. Несмотря на ряд работ, в которых была исследована роль этого мотива в процессах гомоолигомеризации HspB4 и HspB5 [66], а также гетероолигомеризации между HspB1 и HspB6 [119], на данный момент отсутствует общая теория, описывающая роль N-концевого домена и в частности консервативного sRLFDQxFG мотива в процессах гомо- и гетероолигомеризации между малыми белками теплового шока. В качестве объектов исследования нами были выбраны пять совместно экспрессирующихся в мышечной и сердечной ткани белков HspB1, HspB5, HspB6, HspB7 и HspB8. В ходе выполнения работы было проведено подробное сравнение структуры и свойств пяти α -кристаллиновых доменов этих белков, а также была изучена роль N-концевого домена этих белков в процессах гомо- и гетероолигомеризации. В связи с тем, что по данным литературы точечные мутации вблизи sRLFDQxFG мотива HspB6 коррелируют с возникновением кардиомиопатий, молекулярный механизм которых оставался неизвестным, было проведено изучение физико-химических свойств указанных мутантных форм HspB6. Наконец, отдельное внимание в данной работе уделено свойствам N-концевого домена двух мало изученных белков HspB7 и HspB8.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Получение плазмид и генно-инженерных конструкции

Молекулярно-генетические конструкции HspB1R27A, HspB5R22A, HspB5 Δ 21-25, HspB6R27A, HspB6S10F, HspB6P20L, HspB6 Δ 26-30 в векторах pET22b или pET23b были получены в компании «Евроген». Плазмиды HspB7WT, HspB7 Δ 13 (удалены 1-13 остатки) и HspB7 Δ Ser (удалены 17-29 остатки) были любезно предоставлены к.б.н. Мурановой Л.К. [125]. кДНК молекулярно-генетической конструкции pET23a с оптимизированным 5'-концом нуклеотидной последовательности BAG3 была получена от м.н.с. Заболоцкого А.С. Плазида pET23b, содержащая последовательность 14-3-3 γ , была взята из банка плазмид лаборатории [127]. Конструкции α -кристаллиновых доменов (B1ACD₈₄₋₁₇₀, B5ACD₆₄₋₁₅₀, B6ACD₆₄₋₁₄₉, B7ACD₇₁₋₁₅₄, B8ACD₈₅₋₁₇₁), а также делеционная форма HspB1 Δ 26-30 были получены методом ПЦР с использованием кДНК полноразмерных sHsp и специфических праймеров (Приложение 1). Полученные конструкции были клонированы в вектор pET23a или pET23b (Приложение 2) по сайтам рестрикции *NdeI* и *XhoI*. Синтез праймеров осуществляли в компании «Евроген» и «Lumiprobe». ПЦР продукты подвергали препаративному ДНК-электрофорезу в 1% агарозном геле. Фрагменты ДНК выделяли из геля с использованием набора Promega wizard (A9281), после чего, полученные последовательности клонировали в векторы pET22b или pET23a по сайтам рестрикции *NdeI* и *XhoI*. Для этого вектор и вставку одновременно обрабатывали двумя эндонуклеазами рестрикции *NdeI* («NEB») и *XhoI* («NEB») в течение 2 ч при 37 °С. Рестриктазы инактивировали при 65 °С в течение 10 мин.

Вектор после рестрикции подвергали обработке щелочной фосфатазой FastAP («ThermoScientific»). Рестриктсионные фрагменты очищали через 1% агарозный гель. Лигирование фрагментов и вектора проводили T4-ДНК лигазой («Fermentas»). Молярное соотношение вектор: вставка составляло 1:5. Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма TOP10F и высевали на твердую среду LB-агар, содержащую 100 мкг/мл ампициллина. Скрининг бактериальных колоний на наличие плазмиды, содержащей вставку, проводили с использованием праймеров, комплементарных области T7-промотора (T7-prom_long) и T7-терминатора (T7-term_long) вектора pET22 или pET23. Клетки *E. coli*, содержащие по результатам скрининга ожидаемую вставку, наращивали в течение ночи при 37 °С при перемешивании 196 об/мин в 10 мл однократной среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Плазмиды выделяли с помощью набора Promega wizard MiniPreps DNA Purification System (A1460). Правильность молекулярно-генетических конструкций была подтверждена секвенированием («Евроген»).

2. Приготовление компетентных клеток и их трансформация

Клетки *E. coli* штаммов TOP10F, BL21(DE3) или BL21(DE3)pLysS, Rosetta2(DE3)PLysS (супендированные в LB, содержащей 7% ДМСО, хранящиеся при -70 °С) переносили в 10 мл однократной среды LB и растили ночь при перемешивании (196 об/мин) при 37 °С (инкубатор New Brunswick Scientific). Все операции проводили в стерильных условиях. На следующий день 10 мл клеточной суспензии переносили в 190 мл жидкой среды LB и растили при 37 °С до достижения OD₆₀₀ 0.3-0.4. Далее клеточную суспензию охлаждали 30 мин на льду при перемешивании и центрифугировали 15 мин при 4 °С при 4500 g. Супернатант стерильно удаляли, осадок ресуспендировали в холодном стерильном TSS буфере из расчета 7 мл TSS на 200 мл исходной среды (до центрифугирования). Состав буфера TSS: однократная среда LB pH 6.5, содержащая 10% ПЭГ Mr 6000, 5% ДМСО, 50 мМ MgCl₂. Полученную суспензию оставляли на льду на 15 мин. Компетентные клетки *E. coli* расфасовывали по 100-200 мкл, быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -70 °С.

Для трансформации аликвоту компетентных клеток размораживали на льду в течение 2-3 мин, добавляли плазмиду (не менее 50 нг ДНК) и инкубировали на льду 20 мин. Суспензию клеток подвергали тепловому шоку (42 °С, 45 сек), быстро переносили в лед, добавляли до 1000 мкл однократной среды LB и инкубировали 1 час при 37 °С при перемешивании. По окончании инкубации 50-100 мкл суспензии клеток высевали на твердую среду LB-агар, содержащую селективный антибиотик (конечная концентрация ампициллина 100 мкг/мл, хлорамфеникола 35 мкг/мл). Одиночные колонии скалывали, переносили в 5 мл однократной среды LB с селективным антибиотиком и растили ночь (200 об/мин) при 37 °С. Из ночных культур готовили стоковые растворы (суспензии бактерий в LB, содержащей 7% ДМСО для хранения при -70 °С).

3. Экспрессия белков

Компетентные клетки *E. coli* штамма BL21(DE3), BL21(DE3)PLysS, или Rosetta2(DE3)PLysS трансформировали плазмидами pET22b или pET23 (Приложение 2), содержащими кодирующие последовательности белков. Одиночные колонии подращивали в 5-50 мл 1xLB в течение ночи при 37 °С. Оптимальные условия для экспрессии белок определяли, проводя подбор условий. Наибольшие выходы белка были достигнуты при двух условиях культивирования:

- 1) В первом случае 40 мл ночной культуры бактерий инокулировали в 800 мл среды 1-кратного LB (25 мг/мл) или SB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина; растили при 37 °С до OD 0.6-0.8; экспрессию индуцировали IPTG до конечной концентрации (0.1-1 мМ) и экспрессировали при 37 °С в течение 5-6 часов.

2) Во втором случае 5 мл ночной культуры бактерий инокулировали в 800 мл среды с 3-кратным LB (75 мг/мл), содержащей 100 мкг/мл ампициллина, растили 8 ч при 37 °С, экспрессию активировали методом автоиндукции, культивируя бактерий в течение ночи при 30 °С или 20 °С.

Клеточную суспензию бактерий центрифугировали при 4000g в течение 15 мин, супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 30-40 мл лизис-буфера А (50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 15 мМ β-МЭ, 0.1 мМ ФМСФ), замораживали и хранили при -20 °С.

Белок 14-3-3γ и BAG3 экспрессировали в среде с однократным LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина; клетки растили при 37 °С до OD 0.6-0.8; экспрессию индуцировали IPTG до конечной концентрации 1 мМ и экспрессировали при 37 °С в течение 5-6 часов. Клетки осаждали и ресуспендировали в 30-40 мл лизис-буфера А, замораживали и хранили при -20 °С [152, 142].

4. Выделение и очистка малых белков теплового шока

Выделение α-кристаллиновых доменов, sHsp дикого типа и их мутантных форм проводили по стандартной методике (рис. 11), разработанной в нашей лаборатории [153, 127].

Клеточную суспензию в лизис-буфере А размораживали, добавляли раствор лизоцима для разрушения клеточных стенок до конечной концентрации 0.05 мг/мл. Суспензию инкубировали 30 мин на льду после чего к пробе добавляли MgCl₂ до конечной концентрации 1.75 мМ и ДНКазу I до конечной концентрации 2.5 мкг/мл. Суспензию оставляли на 30 мин на льду, после чего обрабатывали ультразвуком (ультразвуковой диспергатор Branson, 3 цикла по одной минуте при мощности 10-20%) и центрифугировали 20 мин при 20000 g. Супернатант (S1) отбирали, а осадок (P1) ресуспендировали, повторно обрабатывали ультразвуком и центрифугировали в тех же условиях. Супернатанты (S1 и S2), полученные в результате двух центрифугирований, объединяли и фракционировали сульфатом аммония в интервале 0-40 % насыщения (интервал 20-60% сульфата аммония использовали при выделении α-кристаллиновых доменов). Суспензию инкубировали 1 ч при охлаждении и медленном перемешивании и центрифугировали 20 мин при 20000 g. Сульфат-аммонийный осадок (P3) растворяли в минимальном объеме буфера Б (20 мМ Трис-ацетат pH 7.6, 10 мМ NaCl, 0.1 мМ ЭДТА, 15 мМ β-МЭ, 0.1 мМ ФМСФ) и диализовали ночь при +4 °С против 2 л буфера Б. Диализат использовали для дальнейшей очистки.

При использовании ионообменной хроматографии для очистки α-кристаллиновых доменов и малых белков теплового шока, представленных большими олигомерами (Приложение 2), диализат центрифугировали 30 мин при 105000 g, супернатант разводили буфером Б с повышенным содержанием соли (80 мМ NaCl) до 60 мл и порциями по 20 мл наносили на колонку HiTrapQ 5 мл (Amersham Biosciences), уравновешенную буфером Б, со скоростью 3 мл/мин.

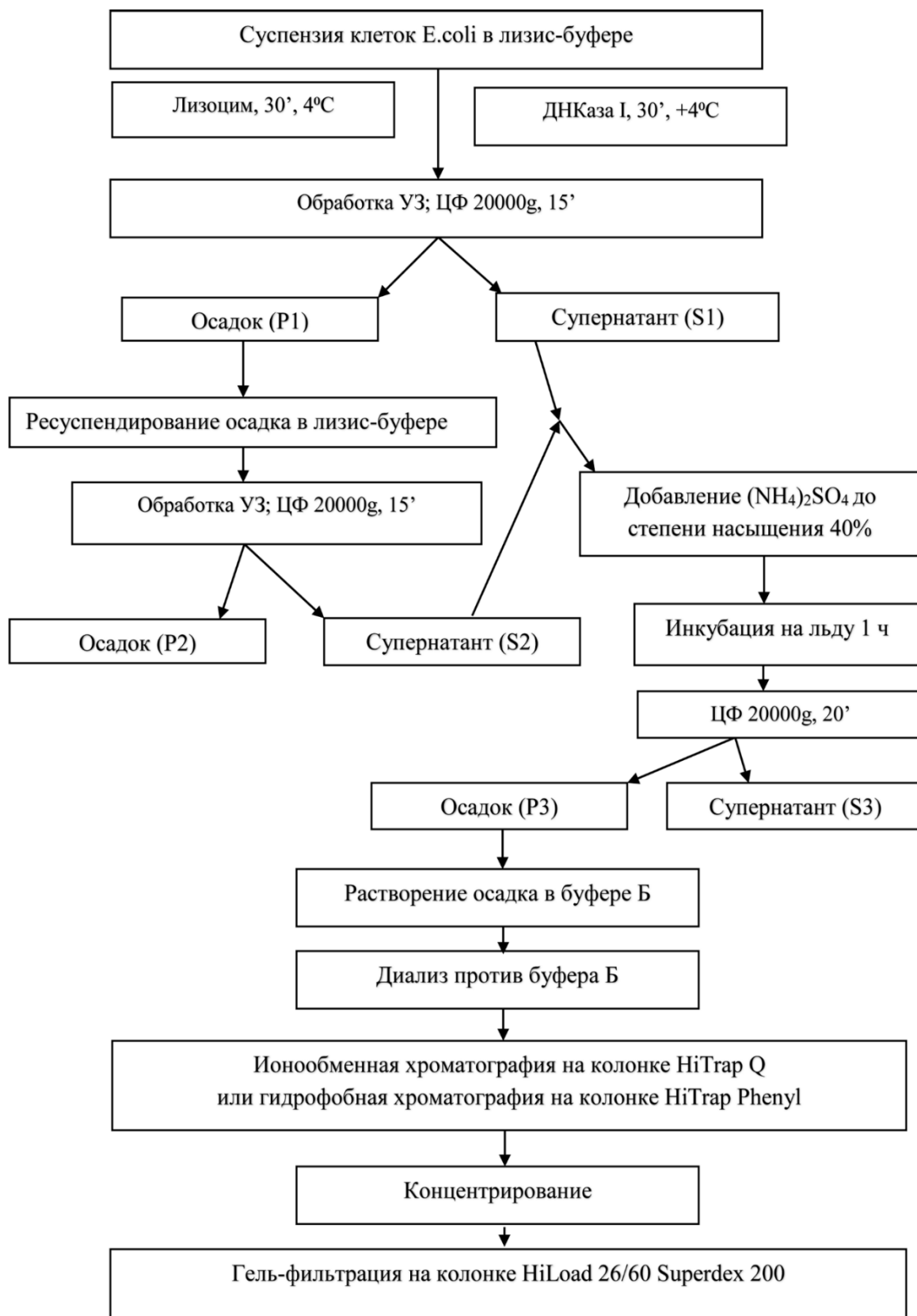


Рис. 11. Схема выделения и очистки малых белков теплового шока. УЗ – обработка ультразвуком, ЦФ – центрифугирование.

В случае α -кристаллиновых доменов диализат после центрифугирования разводили обычным буфером Б. Колонку промывали 20 мл (4 объема колонки (CV)) буфера Б и проводили элюцию

линейным градиентом NaCl (10-360 мМ) в 60 мл (12 CV) буфера Б. Хроматографию проводили при скорости элюции 3 мл/мин и собирали фракции объемом 1-2 мл.

При применении гидрофобной хроматографии для очистки малых белков теплового шока, представленных малыми олигомерами (Приложение 2), диализат центрифугировали 30 мин при 105000 g, разводили буфером Б до 60 мл. Из полученного раствора отбирали 20 мл и добавляли сухой сульфат аммония при перемешивании до конечной концентрации 0.25-0.5 М. Раствор белка наносили на колонку HiTrap Phenyl-Sepharose 5 мл (Amersham Biosciences), уравновешенную 50 мМ Трис-ацетатом pH 8.0, содержащим 15 мМ β-МЭ и 0.25 М сульфата аммония, со скоростью 2 мл/мин. Колонку промывали 20 мл (4 CV) буфера Б, содержащего 0.25 М сульфата аммония и проводили элюцию линейным убывающим градиентом сульфата аммония. При этом применяли два участка линейного градиента. На первом участке (5 CV) концентрация сульфата аммония уменьшалась со 100% (0.25 М) до 5% (0.01 М), на втором участке (5 CV) концентрация сульфата аммония уменьшалась с 5% до 0.1%. После чего колонку промывали 3 объемами 50 мМ трис-ацетата (pH 8.0), содержащего 15 мМ β-МЭ.

Белковый состав полученных фракций анализировали, с помощью метода электрофореза в 12.5 % ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) по методу Лэммли. Наиболее обогащенные белком фракции объединяли и концентрировали, используя метод ультрафильтрации на фильтрах Millipore под давлением в 5 атм.

Концентрированный препарат белка наносили порциями на колонку HiLoad 26/60 Superdex 200 (объем 320 мл), предварительно уравновешенную буфером С (20 мМ Трис-ацетат pH 7.6, 150 мМ NaCl, 0.1 мМ ЭДТА, 15 мМ β-МЭ, 0.1 мМ ФМСФ). Скорость элюции составляла 2 мл/мин, объем собираемых фракций составлял 3 мл. Фракции, содержавшие высокоочищенный белок, объединяли и концентрировали методом ультрафильтрации. Конечный препарат белка диализовали в течение ночи против 2 л буфера Б, в котором меркаптоэтанол был заменен на 2 мМ ДТТ. После диализа белок разделяли на алиquotы (по 50-100 мкл) и хранили при -20 °С.

Выделение HspB7 проводили, как из телец включения, так и из растворимой фракции. В первом случае использовали метод, описанный Астана и соавторами [154]. Тельца включения промывали 2 раза буфером D (20 мМ фосфатного буфера pH 7.4, 100 мМ NaCl, 2 мМ ДТТ, 0.05% Тритон-X100, 0.1 мМ ФМСФ) и экстрагировали HspB7 с помощью 5 мл буфера А, содержащего 6М мочевины, в течение ночи. Далее пробу разводили до 50 мл буфером А и диализовали против буфера Б в течение ночи, после чего препарат наносили на колонку 5 мл HiTrapQ, уравновешенную буфером Б. Колонку промывали (4CV) и элюировали белок линейным градиентом NaCl (10-360 мМ). Фракции, содержащие HspB7, собирали, концентрировали и наносили на колонку HiLoad 26/60 Superdex 200, предварительно уравновешенную буфером С. В

этих условиях HspB7 элюировался в крайне гетерогенной форме, содержащей множество пиков на профиле элюции. Полученный препарат белка был крайне нестабилен и преципитировал при хранении в растворе и после размораживания.

Для выделения HspB7 из растворимой фракции применяли два подхода. Клеточную суспензию гомогенизировали в лизис-буфере А, содержащем 2 мМ ДТТ. Полученный экстракт подвергали фракционированию сульфатом аммония 0-30 %. В первом случае осадок растворяли и диализовали против буфера Е (20 мМ Трис-ацетат рН 8.0, 10 мМ NaCl, 0.1 мМ EDTA, 0.1 мМ ФМСФ, 2 мМ ДТТ), наносили на колонку 5 мл HiTrapQ, уравновешенную буфером Е. Колонку промывали (4CV) и элюировали белок линейным градиентом NaCl (10-360 мМ). Собирали фракции, содержащие HspB7, концентрировали и наносили на колонку HiLoad 26/60 Superdex 200, уравновешенную буфером С, содержащем 2 мМ ДТТ вместо β-МЭ. Во втором случае осадок после фракционирования растворяли в буфере F (20 мМ Трис-ацетат рН 8.0, 0.1 мМ ЭДТА, 0.1 мМ ФМСФ, 2 мМ ДТТ), центрифугировали (12.000 g, 15 мин), добавляли сульфат аммония до 0.3 М. Препарат наносили на колонку 5 мл HiTrap Phenyl, уравновешенную буфером F, содержащим 0.3М сульфата аммония. В указанных условиях часть HspB7 не сорбировалась на колонке и была представлена во фракциях «проскока». Колонку промывали 25 мл (5CV) буфера F, содержащего 0.3 М сульфата аммония и проводили элюцию линейным убывающим градиентом сульфата аммония. При этом применяли два участка линейного градиента. На первом участке (5 объемов колонки) концентрация сульфата аммония уменьшалась со 100 % (0.3 М) до 5 % (0.01 М), на втором участке (7 CV) концентрация сульфата аммония уменьшалась с 5 % до 0.1%. HspB7, полученный как во фракциях проскока так и во фракциях, элюированных с колонки, концентрировали и наносили на колонку HiLoad 26/60 Superdex 200, уравновешенную буфером С, содержащем 2 мМ ДТТ вместо β-МЭ. Очищенные белки концентрировали, диализовали против буфера Б, аликвотили и хранили при -20 °С.

Концентрацию белка определяли, применяя весовые коэффициенты экстинкции $A^{0.1\%}_{280}$: HspB1WT, R27A – 1.775; HspB1Δ26-30 – 1.825; HspB5WT, R22A – 0.694; HspB5Δ21-25 – 0.715; HspB6WT, R27A, P20L, S10F – 0.582; HspB6Δ26-30 – 0.603; HspB8WT, Cys – 1.225; B1ACD – 0.87; B5ACD – 0.15; B6ACD – 0.16; B7ACD – 0.16; B8ACD – 0.73. Концентрацию HspB7WT, Δ13, ΔSeg определяли по микрометоду Брэдфорда, используя БСА в качестве стандарта.

5. Очистка и выделение белков-партнеров

Выделение и очистку белков BAG3 и 14-3-3γ проводили по аналогичному описанному выше протоколу с некоторыми модификациями [142, 127]. В этом случае к супернатанту (S1+S2) добавляли сульфат аммония до степени насыщения 30 % в случае BAG3 и 50 % в случае 14-3-3γ.

Суспензию инкубировали 1 ч при охлаждении +4 °С и медленном перемешивании и после центрифугировали 20 мин при 20000 g. Сульфат-аммонийный осадок (РЗ) растворяли в минимальном объеме буфера Б (20 мМ Трис-ацетат рН 7.6, 10 мМ NaCl, 0.1 мМ ЭДТА, 15 мМ β-МЭ, 0.1 мМ ФМСФ) и диализовали ночь при 4 °С против 2 л буфера Б. Диализат использовали для дальнейшей очистки. Диализат центрифугировали 30 мин при 105000 g, далее порциями по 20 мл наносили на колонку HiTrapQ 5 ml (Amersham Biosciences), уравновешенную буфером Б, со скоростью 3 мл/мин. Колонку промывали 20 мл (4 CV) буфера Б и проводили элюцию линейным градиентом NaCl (10-500 мМ) в 60 мл (12 CV) буфера Б. Хроматографию проводили при скорости элюции 3 мл/мин и собирали фракции объемом 1-2 мл. Обогащенные белком фракции собирали, концентрировали и наносили на колонку HiLoad 26/60 Superdex 200, уравновешенную буфером Б с концентрацией NaCl 150 мМ. Фракции, содержавшие высокоочищенный белок, объединяли и концентрировали методом ультрафильтрации. Конечный препарат белка диализовали в течение ночи против 2 л буфера Б, в котором меркаптоэтанол был заменен на 2 мМ ДТТ. После диализа белок разделяли на алиquotы (по 50-100 мкл) и хранили при -20 °С. Концентрацию белка определяли, применяя весовые коэффициенты экстинкции $A^{0.1\%}_{280}$: BAG3 – 0.6; 14-3-3γ – 1.13.

6. Методы исследования структуры и свойств белков

6.1. Флуоресцентные методы исследования

Влияние мутаций на термо-индуцированную агрегацию HspB6 и его мутантных форм измеряли, регистрируя светорассеяние при равномерном (1 градус в минуту) нагревании пробы от 20 до 85 °С. Пробы белка (0.3 мг/мл) в буфере F (20 мМ HEPES/NaOH рН 7.5, 100 мМ NaCl, 2 мМ ДТТ) помещали в кюветодержатель, оснащенный элементами Пельтье, и светорассеяние измеряли на скрещенных монохроматорах, освещая образец светом 340 нм (ширина щели 2.5 нм) и регистрируя при 340 нм (ширина щели 5 нм) на спектрофлуориметре CaryEclipse (Varian).

Гидрофобные свойства поверхности HspB6 и его мутантных форм исследовали с помощью флуоресцентной пробы bis-ANS. К пробе объемом 600 мкл с концентрацией белка 0.03 мг/мл в буфере FF (20 мМ HEPES/КОН рН 7.3, 150 мМ NaCl, 0.1 мМ ЭДТА и 15 мМ β-МЭ) добавляли порциями 2-4 мкл 180-230 μМ раствора bis-ANS, приготовленного на MQ, до конечной концентрации 10-13 μМ. После добавления каждой алиquotы раствор инкубировали не менее 1 мин. Флуоресценцию возбуждали светом с длиной волны 385 нм (ширина щели 5 нм), флуоресценцию регистрировали при 495 нм (ширина щели 5 нм), измерения проводили на спектрофлуориметре CaryEclipse (Varian) при 25 °С и напряжении на ФЭУ 600-700 В.

6.2. Измерение шапероноподобной активности малых белков теплового шока

Для оценки шапероноподобной активности HspB6 использовали два модельных субстрата, агрегирующих при разных условиях. В первом случае агрегацию глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД), выделенную из скелетной мышцы кролика, проводили в 50 мМ фосфатном буфере pH 7.4 при концентрации белка 0.05 мг/мл. HspB6 дикого типа и его мутантные формы смешивали с ГАФД в весовом соотношении 20/1. Агрегацию ГАФД индуцировали нагреванием до 45 °С, регистрируя изменение оптической плотности при 340 нм. Во втором случае агрегацию дрожжевой алкогольдегидрогеназы (АДГ) проводили в 50 мМ фосфатном буфере pH 7.4 при концентрации белка 0.15 мг/мл. HspB6 дикого типа и его мутантные формы смешивали с АДГ в весовом соотношении 1/3. Пробы преинкубировали 5 мин при 42 °С, затем добавляли ДТТ и ЭДТА до конечных концентраций 20 мМ и 3 мМ соответственно и регистрировали изменение оптической плотности при 340 нм. Все измерения проводили на спектрофотометре Ultrospec 3100 (Amersham).

6.3. Фосфорилирование HspB6 сАМР-зависимой протеинкиназой

Фосфорилирование HspB6 (1 мг/мл) проводили в буфере Р (25 мМ HEPES/NaOH pH 7.5, 25 мМ β-глицерофосфата, 5 мМ MgCl₂, 2 мМ ДТТ, 1 мМ АТР), инкубируя белок с каталитической субъединицей сАМР-зависимой протеинкиназы (1000 единиц активности в пробе, Р6000S, NEB) при 37 °С. В течение разных периодов времени из реакционной смеси отбирали аликвоты и останавливали реакцию добавлением 2-х кратного буфера для образцов (10 мМ Трис/глицин pH 8.6, 8 М мочевины, 15 мМ β-МЭ, бромфеноловый синий). Полученные пробы анализировали методом электрофореза в присутствии мочевины [155].

Эффективность фосфорилирования также оценивали по включению радиоактивного фосфата в структуру HspB6. В этом случае HspB6 (0.5 мг/мл) инкубировали в буфере Р, содержащем 100 мМ АТР и следовые количества γ-³²P-АТР, с каталитической субъединицей сАМР-зависимой киназы (1000 единиц активности в пробе) при 37 °С. Из реакционной смеси отбирали аликвоты и наносили на фильтры Whatman 3ММ, после чего промывали раствором 10% трихлоруксусной кислоты, содержащем 5 мМ фосфата натрия и 5 мМ пирофосфата натрия. Радиоактивный счет проводили на жидком сцинтилляционном счетчике RackBetta [156].

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

7.1. Анализ четвертичной структуры sHsp и α -кристаллиновых доменов

Олигомерное состояние малых белков теплового шока дикого типа и их мутантных форм исследовали методом гель-фильтрации на колонке Superdex 200 HR Increase 10/300 GL. Образцы, содержащие 10-360 мкг белка, растворяли в буфере С (20 мМ Трис-НСl рН 7.6, 150 мМ NaCl, 0.1 мМ ЭДТА, 14 мМ β -МЭ, 0.1 мМ ФМСФ) и 80-100 мкл раствора белка наносили на колонку. Хроматографию проводили при скорости элюции 0,5-0,75 мл/мин. Профили элюции нормировали на максимальное значение, получая таким образом нормированное значение оптической плотности. Колонку калибровали белками-стандартами: тироглобулином (669 кДа), ферритином (440 кДа), димером (136 кДа) и мономером (68 кДа) бычьего сывороточного альбумина, овальбумином (43 кДа), химотрипсиногеном (25 кДа), РНКазой (13,7 кДа). Молекулярные массы рассчитывали на основе калибровочной кривой ($y=38.85-5.15*\log(M)$), где y – объем элюции, M – молекулярная масса в Да).

Исследование четвертичной структуры α -кристаллиновых доменов проводили методом аналитической гель-фильтрации. На колонку Superdex 75, уравновешенную буфером В (50 мМ фосфатного буфера рН 7.4, 150 мМ NaCl, 2 мМ ДТТ, 0.1 мМ ФМСФ), наносили разные количества белка (16-150 мкг), растворенные в 100 мкл буфера В. Кажущуюся константу диссоциации оценивали по изменению объема элюции ACD от количества белка, нанесенного на колонку, аппроксимируя зависимость гиперболическим уравнением $V_e = A - B * C / (K_d + C)$, где V_e – объем элюции, A и B – параметрические константы, K_d – кажущаяся константа диссоциации, а C – концентрация ACD [157]. При исследовании олигомерной структуры полноразмерных белков на колонку Superdex 75, уравновешенную буфером В, наносили 30-40 мкг белка (HspB6, HspB7, HspB8) в 100 мкл буфера В. Структуры ACD моделировали с помощью программы AlphaFold2 [158] в режиме мультимеров.

Значения молекулярных масс белков, элюирующихся в ходе гель-фильтрации на колонке Superdex 200 HR Increase 10/30 GL (GE Healthcare), были определены с помощью детектора многоугольного светорассеяния (MALS) miniDAWN (Wyatt Technology), сопряженного детектором UV-Vis Prostar 335 (Varian). Для этого 200-250 мкг белка наносили на колонку, уравновешенную буфером С с 2 мМ ДТТ в случае HspB8 WT, B1ACD или B8ACD или уравновешенную буфером С, не содержащем восстановителей, в случае HspB8Cys. Количество

белка в пиках элюции оценивали по поглощению при 280 нм и значение dn/dc принимали равным 0.185. Сигналы с детектора были обработаны в программе ASTRA 8.0 (Wyatt Technology). Окисление HspB8Cys проводили в ходе диализа против буфера D (50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂) в течение ночи при +4 °C [106]. После диализа степень химического сшивания определяли методом электрофореза по Лэммли без использования восстановителей. Автор благодарен д.б.н. Н.Н. Случанко за помощь в проведении SEC-MALS экспериментов.

Влияния краудинга (crowding) на олигомерное состояние HspB6 и его мутантных форм анализировали методом гель-фильтрации в присутствии осмолита триметиламинооксида (ТМАО). На колонку Superdex 200 HR Increase 10/30 GL, уравновешенную буфером S (20 мМ Tris-HCl pH 7.6, 0.5 М ТМАО, 150 мМ NaCl, 0.1 мМ ЭДТА, 14 мМ β-МЭ, 0.1 мМ ФМСФ), наносили пробу, содержащую по 250 мкг HspB6, предварительно инкубированную (30 мин при 37 °C) в 100 мкл буфера S. Хроматографию проводили при скорости элюции 0.75 мл/мин.

7.2. Исследование белок-белковых взаимодействий в гетероолигомерных комплексах sHsp

Метод гель-фильтрации был использован для анализа олигомерного состояния гетероолигомерных комплексов, образованных разными малыми белками теплового шока друг с другом, а также с ACD. Эквимольные смеси двух анализируемых малых белков теплового шока или смеси sHsp с ACD инкубировали в течение часа либо при 4 °C, либо при 42 °C. При низкой температуре скорость обмена субъединиц обычно ничтожно мала, а при высокой температуре процесс обмена субъединиц существенно ускоряется. Хроматографию проводили на колонке Superdex 200 HR Increase 10/30 GL, уравновешенной буфером С, при скорости элюции 0.75 мл/мин и собирали фракции объемом 400 мкл. Белки, элюированные в каждой фракции, осаждали трихлоруксусной кислотой (ТХУ), для этого к 400 мкл проб добавляли 50 мкл концентрированной трихлоруксусной кислоты и инкубировали на льду в течение 30 мин. Осадок белка отделяли центрифугированием на холоду (+4°C) при 11000g, в течение 10 мин. Супернатант удаляли, а осадок суспендировали в 500 мкл ацетона и центрифугировали в тех же условиях. Осадок еще раз отмывали ацетоном и вновь подвергали центрифугированию. Осадок белка растворяли в 20 мкл однократного буфера для образцов и подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по методу Лэммли. Соотношение белков во фракциях определяли по отношению интенсивностей электрофоретических полос, определённых с помощью программы GelAnalyzer.

Для изучения взаимодействия HspB1 или 14-3-3 с фосфорилированной формой HspB6 использовали препарат белка со степенью фосфорилирования 0.8-1.0 моль фосфата на моль

белка. Фосфорилированную форму HspB6 (0.5 мг/мл) инкубировали с 14-3-3 (0.7 мг/мл) в буфере С при 42 °С в течение 1 часа, после чего 100 мкл пробы наносили на колонку Superdex 200 HR Increase 10/300 GL, уравновешенную буфером С.

Для изучения взаимодействия BAG3 с HspB7, HspB8, B7ACD и B8ACD использовали метод гель-фильтрации. В этом случае смеси двух анализируемых белков инкубировали в молярном соотношении 1 к 2 в пользу sHsp или ACD в течение часа при 37 °С. Хроматографию полученной смеси белков проводили на колонке Superdex 200 HR Increase 10/30 GL, уравновешенной буфером С, при скорости элюции 0.75 мл/мин.

7.3. Исследование олигомерного состояния α -кристаллиновых доменов методом динамического светорассеяния

Динамическое светорассеяние (DLS) измеряли в образцах с концентрацией белка 3 мг/мл в буфере Н (20 мМ Трис-ацетат рН 7.6, 10 мМ NaCl, 0.1 мМ ЭДТА, 0.1 мМ ФМСФ). Каждое измерение проводили в течение 25 сек и повторяли 10 раз. Для каждого образца проводили не менее 10 таких циклов измерений. После проведения экспериментов в программе DTS (Nano) определяли размер частиц, анализируя параметр интенсивности рассеяния света.

7.4. Анализ олигомерного состояния α -кристаллиновых доменов методом химического сшивания

Изучение возможности формирования димеров α -кристаллиновых доменов проводили методом химического сшивания. Для этого к ACD (3 мг/мл) в буфере J (25 мМ HEPES рН 7.5) добавляли водный раствор глутарового альдегида до конечной концентрации 0.008% или 0.024% и инкубировали 30 мин при 30 °С. Реакцию останавливали добавлением 4-х кратного буфера для образцов (250 мМ Трис-HCl, рН 6.8; 40% глицерин, 8% SDS, 0.004% бромфенолового синего, 15 мМ β -МЭ), прогревали при 95 °С в течение 5 мин. Пробы наносили на 15% ПААГ и проводили Tricine-SDS электрофорез по методу Шаггера и фон-Ягова [159].

8. Некоторые аналитические методы

8.1. Определение концентрации белка по методу Бредфорда

Для определения концентрации белка к 100 мкл раствора, содержащего от 2 до 10 мкг белка, добавляли 1 мл рабочего раствора Кумасси G250, инкубировали 10-20 мин и измеряли оптическое поглощение при 595 нм. В качестве стандарта использовали раствор БСА. Для приготовления рабочего раствора 10 мг Кумасси G250 растворяли в 5 мл 95% этанола, добавляли

10 мл 85% фосфорной кислоты и доводили объем до 100 мл. Полученный раствор фильтровали и хранили в темноте.

8.2. Электрофорез в присутствии мочевины по методу Перрье-Перри

Для разделения смеси белков по их заряду использовали метод электрофореза в присутствии 8 М мочевины [155]. Для приготовления проб смешивали равные объемы образцов исследуемых белков с 2-кратным буфером для образцов (10 мМ Трис-глицин рН 8.6, 8 М мочевины, 15 мМ МЭ, бромфеноловый синий). На 10% ПААГ наносили 1-5 мкг белка на дорожку. В качестве катодного и анодного буферов использовали (25 мМ трис, 192 мМ глицин рН 8.6). Для приготовления 7.5 мл 10% ПААГ навеску мочевины (2.9 г) растворяли в 3.4 мл 30% акриламида, содержащего 1.6% МБА, добавляли 1 мл 10-кратного электродного буфера и доводили объем до 7.5 мл. Полимеризацию индуцировали внесением 15 мкл ТЕМЕД и 80 мкл 10% ПСА. Перед нанесением образцов проводили пре-электрофорез при силе тока 12 мА в расчете на гель в течение 30 мин, затем наносили образцы и продолжали электрофорез при силе тока 7 мА в течение 2 часов. Гели фиксировали в растворе 10% уксусной кислоты и 20% изопропанола в течение 10-20 мин, окрашивали 20-30 мин 0.3% раствором Кумасси синего R-250, приготовленного на смеси, содержащей 20% изопропанола и 10% уксусной кислоты, отмывали кипячением и сканировали.

8.3. Tricine-SDS электрофорез по методу Шаггера и фон Ягова

Tricine-SDS электрофорез использовали для исследования изолированных α -кристаллиновых доменов, обладающих низкой молекулярной массой (9-10 кДа) [159]. При приготовления образцов к пробам белка добавляли 4-кратный буфер для образцов (250 мМ Трис-НСl, рН 6.8; 40% глицерин, 8% SDS, 0.004% бромфенолового синего, 15 мМ β -МЭ) и прогревали при 95 °С в течение 5 мин. Для приготовления одного 16.5% разделяющего ПААГ (толщина геля 0.75 мм) смешивали 1.65 мл раствора 48% Т АА, содержащего 3% С МБА, 1.66 мл буфера для геля (3.0 М Трис-НСl рН 8.45, 0.3% SDS), 0.53 мл глицерина и 1.15 мл воды. Полимеризацию индуцировали внесением 1.5 мкл ТЕМЕД и 15 мкл 10% ПСА. Для приготовления одного 4% концентрирующего ПААГ (толщина геля 0.75 мм) смешивали 0.160 мл раствора 48% Т АА, содержащего 3% С МБА, 0.5 мл буфера для геля и 1.35 мл воды. Полимеризацию индуцировали внесением 3.5 мкл ТЕМЕД и 24 мкл 10% ПСА.

В качестве катодного буфера использовали 0.1 М Трис-НСl рН 8.25, 0.1М Tricine, содержащий 0.1% SDS, а в качестве анодного – 0.1 М Трис-НСl рН 8.9. Электрофорез проводили при напряжении 30 В на одно стекло до входа бромфенолового синего в разделяющий гель и 250 В после входа красителя в разделяющий гель. После электрофореза гели отмывали 5 раз по 5

минут в растворе 10% уксусной кислоты и 20% изопропанола, после чего окрашивали 0.3% раствором Кумасси синего R-250, приготовленного на смеси, содержащей 20% изопропанола и 10% уксусной кислоты, отмывали кипячением и сканировали.

8.4. Нативный электрофорез

Нативный электрофорез проводили по методу Дэвиса [160] с модификациями. В классическом варианте электрофореза используется дисковая система, где на границе между концентрирующим и разделяющим гелем происходит скачок pH, что может приводить к разрушению комплексов белков или их денатурации. Поэтому для разделения белков использовали только разделяющий ПААГ.

Для приготовления образцов использовали 4-кратный буфер для образцов (40 мМ Трис-глицин pH 8.6, 25% глицерин, 0.004% бромфенолового синего, 15 мМ β -МЭ). sHsp (0.10–0.12 мг/мл или 5–6 мкМ в расчете на мономер) смешивали с разными ACD (0.20–0.24 мг/мл или 20–24 мкМ в расчете на мономер) и инкубировали 30 мин при 25 °С в буфере Б. В качестве электродного буфера использовали 0.08 М Трис-глицинового буфер pH 8.6. Для приготовления разделяющего геля использовали 10-кратный буфер – 0.8 М Трис-HCl pH 8.6. Электрофорез проводили в 12.5% ПААГ толщиной 0.75 мм. Сила тока на один гель составляла 5-10 мА. В лунку наносили 5-7 мкг белка. Гели окрашивали 0.3% раствором Кумасси R-250 в 20% изопропаноле и 10% уксусной кислоте и отмывали в кипящей воде.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Получение препаратов белков

1.1. Выделение малых белков теплового шока

1.1.1. Стандартный протокол выделения

Рекомбинантные малые белки теплового шока и их α -кристаллиновые домены (рис. 12 А) можно эффективно получать в бактериальной системе экспрессии (рис. 12 Б, В, Г). Клетки *E. coli* штаммов BL21(DE3), BL21(DE3)PLysS, Rosetta2(DE3)PLysS трансформировали плазмидами, содержащими кодирующие последовательности белков. Синтез белка индуцировали либо методом автоиндукции в трехкратной среде LB, либо добавлением в однократную среду LB индуктора IPTG, при этом экспрессия сопровождается накоплением рекомбинантного белка в цитоплазматической фракции. В случае полноразмерных малых белков теплового шока и их мутантных форм выделение проводили по стандартному протоколу, разработанному в нашей

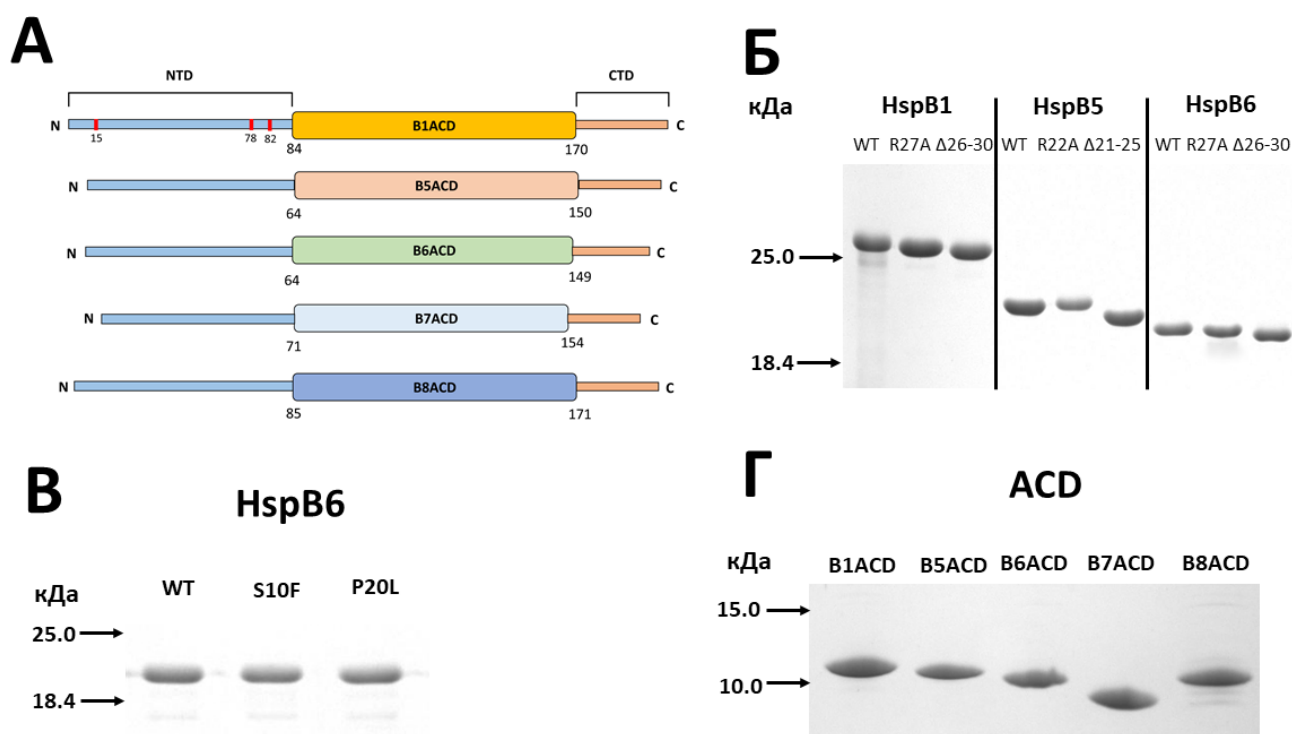


Рис. 12. Анализ чистоты препаратов белков, использованных в данной работе. **А.** Схема строения пяти малых белков теплового шока человека. Крупными цифрами обозначены границы α -кристаллиновых доменов (ACD) в первичных структурах белков, CTD – С-концевой домен, NTD – N-концевой домен. Остатки серина 15, 78, 82 обозначенные цифрами под красными штрихами. **Б.** SDS – электрофорез препаратов HspB1, HspB5, HspB6 и их мутантных форм. **В.** SDS – электрофорез препарата HspB6 и мутантных форм S10F и P20L. **Г.** Tricine-SDS – электрофорез препаратов B1ACD, B5ACD, B6ACD, B7ACD и B8ACD. Положение маркеров молекулярных масс указано стрелками. На каждую дорожку нанесено ~1-2 мкг белка.

лаборатории [153, 127]. После разрушения стенок бактерий под действием лизоцима и после ультразвуковой обработки проводили экстракцию лизис-буфером. Эту операцию повторяли дважды. Полученные после центрифугирования супернатанты объединяли и проводили высаливание целевого белка сульфатом аммония (обычно в интервале 0-40% насыщения). Полученный осадок растворяли и подвергали дальнейшей очистке методом ионообменной хроматографии или гидрофобной хроматографии. Далее белок концентрировали и подвергали очистке методом гель-фильтрации. Фракции, обогащенные целевым белком, отбирали, объединяли, концентрировали, диализовали и хранили при -20°C. Таким образом были получены препараты HspB1, HspB5, HspB6 и HspB8 диких типов; точечные и делеционные мутанты HspB1, HspB5 и HspB6 (рис. 12 Б), а также мутантные формы HspB6 с заменами S10F и P20L (рис. 12 В). α -кристаллиновые домены очищали по аналогичному протоколу с некоторыми модификациями. В частности, при высаливании белка диапазон насыщения сульфатом аммония составлял 20-60%, а дальнейшие стадии очистки также включали ионообменную хроматографию и гель-фильтрацию. Применение такого подхода позволило получить гомогенные препараты пяти α -кристаллиновых доменов малых белков теплового шока (рис. 12 Г). Предложенные методы экспрессии и очистки позволяют получить от 10-155 мг белка с 1 л бактериальной культуры (Приложение 2). По данным электрофореза в присутствии SDS по методу Лэммли чистота полученных препаратов белка составляла не менее 95% (рис. 12 Б, В, Г).

1.1.2. Экспрессия и выделение HspB7

В ходе нашей работы мы столкнулись с необходимостью разработать эффективную методику препаративного выделения HspB7 для изучения его физико-химических свойств и олигомерного состояния. На момент написания работы в литературе было представлено несколько протоколов выделения этого белка. Так, например, в работе китайских исследователей был разработан простой метод выделения рекомбинантного HspB7 крысы, основанный на фракционировании сульфатом аммония, ионообменной хроматографии и гель-фильтрации [161]. В другой работе было описано выделение HspB7 с полигистидиновым тагом (6xHis) путем металл-аффинной хроматографии [162]. Метод, разработанный для выделения рекомбинантного α В-кристаллина, был также применен и для выделения HspB7, однако свойства этого белка авторами не были подробно охарактеризованы [163]. Наконец, в работе Мымрикова и соавторов для выделения HspB7 был использован подход, предложенный для выделения HspB3. Эта методика предполагает экстракцию малых белков теплового шока из телец включения с помощью буфера, содержащего высокую концентрацию мочевины, с последующей ренатурацией полученного белка [21]. По заявлениям авторов, все вышеперечисленные методики выделения позволяют получить гомогенные по данным электрофореза препараты HspB7. При

этом белок во всех случаях был представлен в виде гетерогенной смеси крупных и малых олигомеров (или мономеров) и был не пригоден для подробных физико-химических исследований. Таким образом, предстояло разработать новую методику препаративного выделения и очистки рекомбинантного HspB7 человека.

Экспрессия HspB7 и его делеционных мутантов в штамме Rosetta2(DE3)PlysS при разных условиях показала, что наибольший выход растворимой формы белка достигается при использовании 3-х кратной среды LB и автоиндукции при 20°C в течение ночи. Инкубация при более высоких температурах или индукция IPTG приводили к тому, что большая часть белка оказывалась в тельцах включения (данные не приведены). Попытка экстрагировать HspB7 мочевиной из телец включения по методике предложенной Астана и соавторами [154] и использованной Мымриковым и соавторами [21], оказалась безуспешной, потому что полученный препарат белка был гетерогенным и нестабильным при хранении.

Процедура выделения HspB7 из растворимой фракции по оригинальной методике китайских авторов, предложенной для получения рекомбинантного HspB7 крысы [161], также оказалось мало эффективной, так как на всех этапах выделения рекомбинантный HspB7 человека постоянно выпадал в осадок, что не позволяло получить изолированный белок в достаточном количестве.

Для получения препаративных количеств HspB7 нами была предложена модифицированная методика выделения, применяемая в нашей лаборатории для очистки малых белков теплового шока HspB6 и HspB8. Данный протокол предполагает осаждение клеточных белков сульфатом аммония, гидрофобную хроматографию на фенил-сефарозе с последующей дополнительной очисткой методом гель-фильтрации. В ходе выделения при гидрофобной хроматографии большая часть наносимого HspB7 не сорбировалась на фенил-сефарозе и детектировалась во фракциях «проскока» практически в гомогенном виде (рис. 13 А Фракция 1). Другая часть HspB7 сорбировалась на фенил-сефарозе, элюировалась с колонки уменьшающимся градиентом соли и содержала достаточно большое количество белковых примесей (рис. 13 А Фракция 2). При очистке фракции 1 в ходе препаративной гель-фильтрации часть HspB7 выходила в виде острого пика в исключенном объеме колонки, в то время как большая часть HspB7 элюировалась в составе широкого пика (рис. 13 Б). Фракции, содержащие наибольшее количество белка и наименьшее количество примесей, собирали и анализировали на колонке Superdex 200 Increase. На профиле аналитической гель-фильтрации такой препарат давал только один пик с кажущейся молекулярной массой около 36 кДа (рис. 13 В). Препарат фракции 2 (рис. 13 А Фракция 2), также был дополнительно очищен на колонке Superdex 200. В ходе

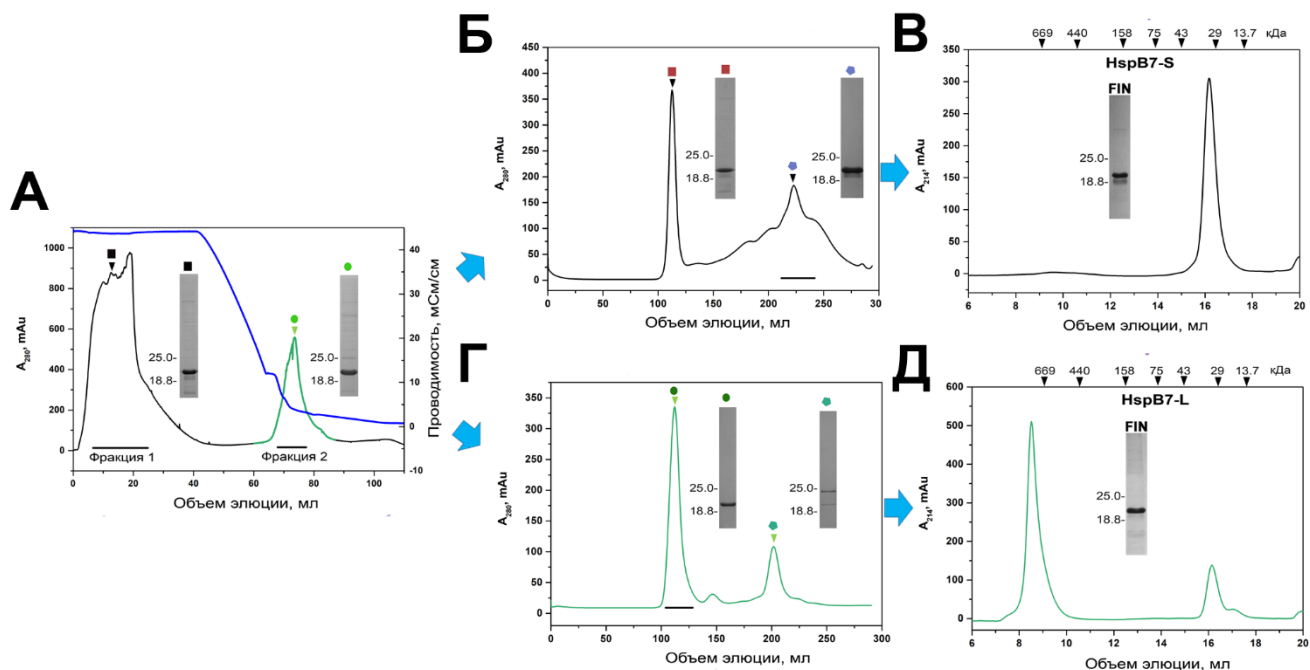


Рис. 13. Выделение рекомбинантного HspB7 из растворимой фракции белков *E. coli* и анализ олигомерного состояния препаратов методами хроматографии. **А.** Гидрофобная хроматография осветленного лизата клеток на фенол-сефарозе. Левая ось соответствует поглощению при 280 нм и показана черной линией с зеленой вставкой (соответствует Фракции 2), правая ось соответствует проводимости и указана синей линией. Фракцию 1 и фракцию 2 собирали по отдельности и наносили на препаративную колонку Superdex 200 (панели **Б** и **Г** соответственно). Фракции, отмеченные черной чертой на панелях **Б** и **Г**, собирали и наносили по отдельности на аналитическую колонку Superdex 200 (панели **В** и **Д** соответственно). Молекулярная масса белков-стандартов отмечена в кДа сверху на панелях **В** и **Д**. Цветные символы на панелях **А**, **Б**, **Г** соответствуют фракциям, в которых был проанализирован белковый состав методом SDS-электрофореза. Результаты электрофореза представлены во врезках на панелях и помечены цветными обозначениями. На панелях **В** и **Д** представлены результаты аналитической гель-фильтрации финальных препаратов HspB7-S и HspB7-L, их чистота (FIN) была определена методом SDS-электрофореза и представлена на врезках.

препаративной гель-фильтрации на профиле элюции были выявлены два пика (рис. 13 Г), где в первом остром пике содержался HspB7, а во втором небольшом пике преимущественно элюировались примесные белки. HspB7, содержащийся в первом пике, собирали и наносили на аналитическую колонку Superdex 200 Increase. В этом случае при аналитической гель-фильтрации детектировали большой пик агрегатов/крупных олигомеров с кажущейся молекулярной массой более 600 кДа и небольшой пик с кажущейся молекулярной массой около 36 кДа (рис. 13 Д). Таким образом, нам удалось разделить рекомбинантный HspB7 на две фракции. Одна из этих фракций преимущественно содержала крупные олигомеры (агрегаты) белка и была обозначена как HspB7-L (рис. 13 Д), а вторая содержала HspB7 преимущественно в виде малых олигомеров и была обозначена как HspB7-S (рис. 13 В).

Получив все необходимые для работы препараты изолированных белков, мы приступили к характеристике их олигомерного состояния, физико-химических свойств и способности к гомо- и гетероолигомеризации.

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

Наиболее консервативным участком в структуре всех sHsp является α -кристаллиновый домен (ACD) (рис. 12 А), который формирует иммуноглобулин-подобную укладку сэндвич-типа. Олигомеризация малых белков теплового шока начинается в первую очередь с взаимодействия антипараллельно ориентированных β 7 складок α -кристаллиновых доменов двух соседних мономеров [35, 38, 1]. На данный момент 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) было изучено значительно хуже.

Олигомерная структура препаратов ACD пяти малых белков теплового шока (B1ACD, B5ACD, B6ACD, B7ACD и B8ACD) была изучена методом аналитической гель-фильтрации. В дополнение для уточнения олигомерного состояния ACD, был также использован метод SEC-MALS, который в наших экспериментальных условиях мог быть применён только для B1ACD и B8ACD, обладающих достаточно высокими коэффициентами экстинкции.

Все ACD элюировались с колонки в виде симметричных пиков, положение которых зависело от природы анализируемых пептидов (рис. 14 А-Д). Так объемы элюции B7ACD и B8ACD были больше объемов элюции всех остальных α -кристаллиновых доменов. Кроме того, в случае B7ACD и B8ACD положения максимумов элюции не зависели от количества белка, нанесенного на колонку (рис. 14 Г и Д). При нанесении на колонку высокой концентрации белка абсолютная молекулярная масса B8ACD, определенная методом SEC-MALS, составила 10.7 кДа, при расчетной массе мономера в 9.6 кДа (рис. 14 Е). Объем элюции B7ACD был чуть больше объема элюции B8ACD, несмотря на то, что расчетные молекулярные массы мономеров этих двух α -кристаллиновых доменов близки по значениям (B8ACD - 9.6 кДа, B7ACD – 9.2 кДа). В силу этого полученные данные позволяют заключить что, как B7ACD, так и B8ACD представлены в растворе в виде мономеров и не формируют устойчивых димеров.

В свою очередь объемы элюции B1ACD, B5ACD и B6ACD существенно зависели от количества наносимого на колонку белка (рис. 14 А-В) и смещались в сторону больших значений при нанесении уменьшающихся количеств белка. Подобное изменение положения максимумов элюции при изменении концентрации белка может указывать на то, что B1ACD, B5ACD и B6ACD образуют димеры, которые диссоциируют при разведении. При высокой концентрации, абсолютная молекулярная масса препарата B1ACD, определенная методом SEC-MALS, составила 17.9 кДа при расчетной массе мономера в 9.7 кДа, что хорошо соответствует

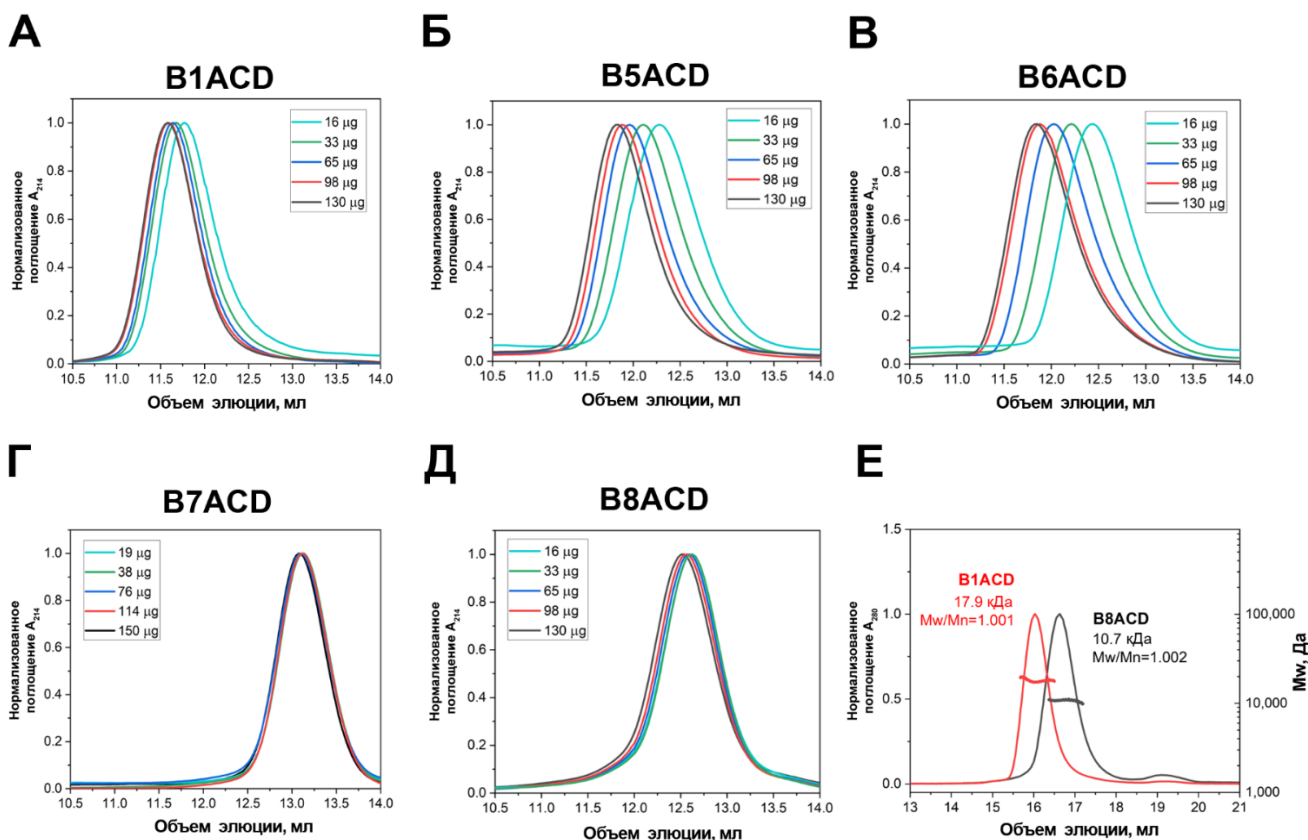


Рис. 14. Анализ стабильности олигомерной структуры пяти АСД. А-Д. Аналитическая гель-фильтрация α -кристаллиновых доменов, нанесенных в разных количествах на колонку Superdex 75. Количество белка, нанесенного на колонку, указано во врезке на каждой панели. Е. Определение абсолютных молекулярных масс В1АСД и В8АСД методом аналитической гель-фильтрации, сопряженной с детектором MALS. На колонку Superdex 200 Increase 10/300 наносили по 180 мкг белка. Полученная молекулярная масса и индекс полидисперсности указаны рядом с пиками элюции.

димерному олигомерному состоянию (рис. 14 Е). Объемы элюции В5АСД и В6АСД близки к объему элюции В1АСД и положение пиков элюции этих α -кристаллиновых доменов также зависит от количества белка, нанесенного на колонку (рис. 14 Б, В). Поэтому можно заключить, что АСД HspB5 и HspB6 в растворе также представлены в виде димеров, диссоциирующих до мономеров при разведении. Для того чтобы сравнить устойчивость димерного состояния изучаемых АСД, можно проанализировать зависимость объемов элюции трех АСД от количества белка, нанесенного на колонку. Изменение равновесия между димерами и мономерами в смеси в упрощенном виде может быть аппроксимировано гиперболической зависимостью, что позволяет оценить кажущиеся константы диссоциации димеров В1АСД, В5АСД и В6АСД. В наших экспериментах K_d этих димеров составили 27, 127 и 162 μM соответственно.

Олигомерное состояние α -кристаллиновых доменов также оценивали с помощью методов химического сшивания и динамического светорассеяния (ДС). α -кристаллиновые домены В1АСД, В5АСД и В7АСД, содержащие одинаковое количество остатков лизина в интерфейсе димеризации, подвергали химическому сшиванию при высокой и низкой концентрации глutarового альдегида (рис. 15). При относительно высокой концентрации белка (3 мг/мл)

химическое сшивание под действием 0.008% глутарового альдегида приводило к формированию димеров у В1АСD и В5АСD, в то время как В7АСD оставался в мономерной форме (рис. 15 А). При более высокой концентрации химической сшивки (0.024%) интенсивность полосы димеров в случае В1АСD и В5АСD многократно возрастала и появлялись дополнительные более высокомолекулярные продукты сшивания. В этих условиях В7АСD также практически не подвергался химическому сшиванию (рис. 15 Б). Схожие результаты были получены и при использовании метода ДЛС для оценки размеров частиц α -кристаллиновых доменов в растворе. При тех же концентрациях белка (3 мг/мл) диаметр частиц В1АСD и В5АСD был равен 4.39 ± 0.29 и 4.34 ± 0.28 нм, соответственно, а в случае В7АСD - 3.18 ± 0.31 нм. На основании данных ДЛС, и считая, что все α -кристаллиновые домены имеют одинаковую глобулярную форму, можно оценить их молекулярные массы [164]. Так, средняя молекулярная масса В1АСD и В5АСD составила 16.2 и 15.9 кДа соответственно, а в случае В7АСD – 9.4 кДа, что хорошо согласуется с предложенной гипотезой о димерном строении α -кристаллиновых доменов HspB1 и HspB5 и мономерном строении В7АСD.

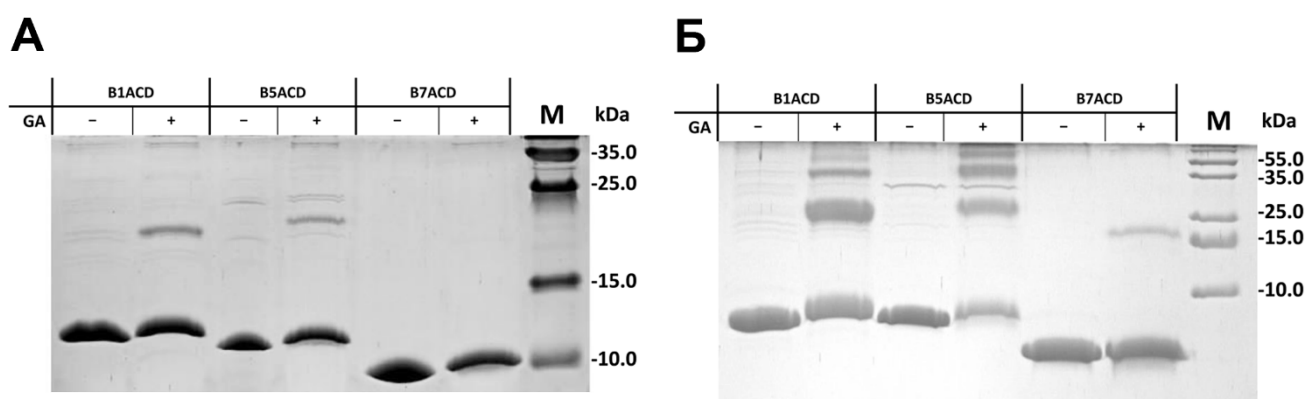


Рис. 15. Химическое сшивание В1АСD, В5АСD и В7АСD глутаровым альдегидом (GA). Сшивание АСD (3 мг/мл) проводили при концентрации глутарового альдегида 0.008% (А) или 0.024% (Б). Продукты сшивания анализировали методом Tricine-SDS-электрофореза.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в растворе В1АСD, В5АСD и В6АСD представлены смесью мономеров и димеров, где наиболее стабильные димеры сформированы В1АСD, и при этом стабильность димеров убывает в ряду В1АСD >> В5АСD > В6АСD. α -кристаллиновые домены HspB7 и HspB8 представлены в виде мономеров и не образуют и стабильных димеров.

Для объяснения столь различного поведения α -кристаллиновых доменов, гомологичных между собой, мы провели подробный анализ их первичной и четвертичной структуры. Используя доступные кристаллические структуры В1АСD, В5АСD и В6АСD, а также моделируя отсутствующие в открытом доступе структуры В7АСD и В8АСD с помощью AlphaFold2 [158], нам удалось показать, что в структурах В1АСD, В5АСD и В6АСD сформирован канонический

интерфейс димеризации, стабилизированный водородными связями и солевыми мостиками (рис. 16 А, Приложение 3). В тоже время в структурах В7ACD и В8ACD некоторые из контактов, критичные для стабилизации димера, отсутствуют (рис. 16 В). Так, например, канонический интерфейс В1ACD сформирован за счет 10 водородных связей между группами СО 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. 16 А) [42]. Аналогичные межмолекулярные контакты были обнаружены в кристаллических структурах димеров В5ACD и В6ACD [35]. Указанные солевые мосты необходимы для поддержания канонической структуры димера АСD. Прочность такого интерфейса, вероятно, дополнительно определяется количеством водородных связей между $\beta 7$ складками мономеров. Действительно, оценка прочности интерфейса с использованием алгоритма PRODIGY [165], который учитывает все виды межмолекулярных контактов между субъединицами, показывает, что расчетные константы диссоциации димеров для В1ACD, В5ACD и В6ACD составляют 50, 150 и 530 нМ соответственно. Данная количественная оценка K_d интерфейсов, вероятно, далека от истинных значений, тем не менее, полученные значения

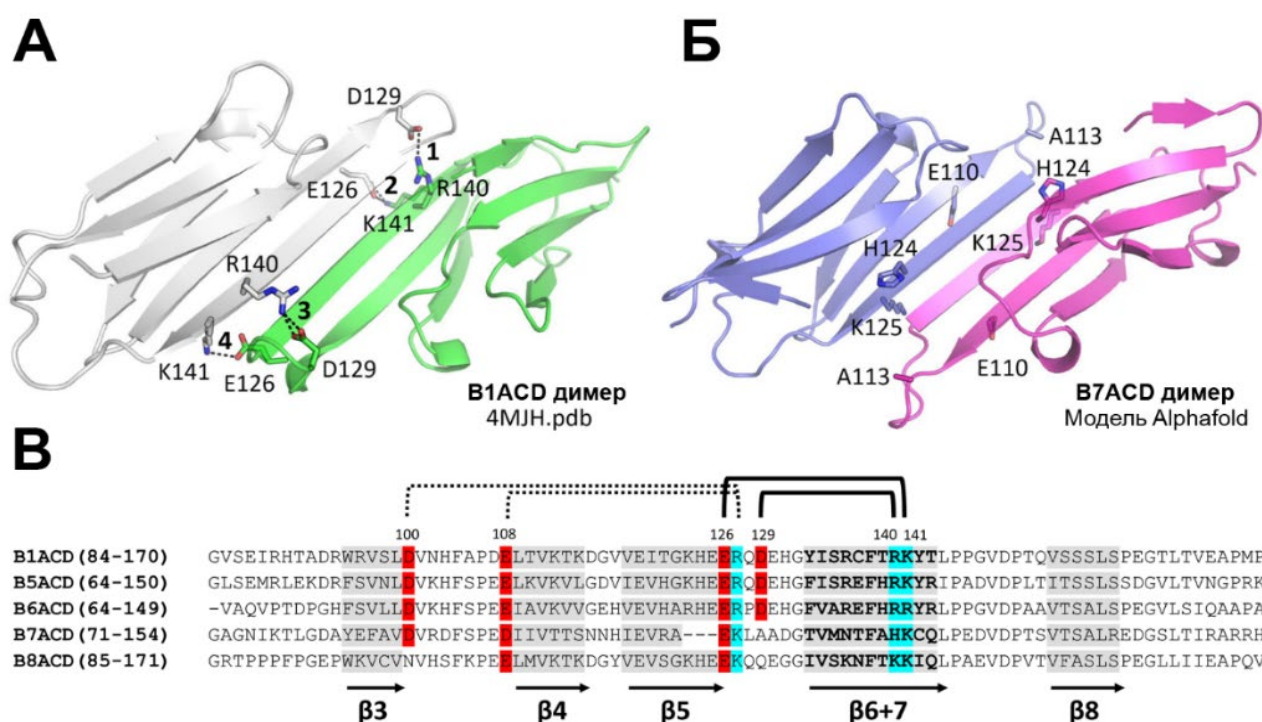


Рис. 16. Структурные особенности строения интерфейсов димеризации разных sHsp. Приведено сравнение структур α -кристаллиновых доменов В1ACD (А) и В7ACD (Б), показано наличие четырех солевых мостов (отмечены номерами на панели А) в структуре В1ACD и отсутствие солевых контактов в структуре В7ACD. В. Множественное выравнивание α -кристаллиновых доменов пяти sHsp человека. Границы α -кристаллиновых доменов указаны номерами остатков. β -складки выделены тёмно-серым цветом и отмечены стрелками. Остатки аминокислот, принимающих участие в образовании солевых контактов, указаны номерами, соответствующие позициям в структуре полноразмерного HspB1, и выделены цветом. Остатки аминокислот, заряженные положительно, отмечены голубым, отрицательно заряженные – красным. Солевые мостики между мономерами указаны черными скобками. Дополнительные ионные контакты, обнаруженные в некоторых кристаллических структурах указаны пунктирными скобками. Выравнивание проводилось с помощью алгоритма Tcoffee (<https://tcoffee.crg.eu>).

хорошо коррелируют с результатами, полученными нами при анализе олигомерного состояния ACD методом гель-фильтрации (рис. 14 А-В).

Выравнивание первичных структур В7ACD и В8ACD показывает, что в гомологичных положениях у этих белков находятся аминокислотные остатки, не способные образовывать ионные связи. Так консервативный Arg140 заменен на His у В7ACD или Lys у В8ACD, Asp129 замещен на Ala у В7ACD или Gln у В8ACD (рис. 16 В). В дополнение к этому стоит отметить, что при моделировании структур димеров В8ACD и особенно димеров В7ACD с помощью программы AlphaFold2 были получены отличающиеся варианты структур (Приложение 3). Так, в нескольких вариантах структур В7ACD были получены димеры с каноническим $\beta 7/\beta 7$ интерфейсом, но скрепленные значительно более короткими β -складками (рис. 16 Б) и соединенные всего лишь 6 водородными связями. Также несколько вариантов предсказанных структур В7ACD, содержали неканонический $\beta 4/\beta 8$ интерфейс димеризации (Приложение 3). Полученные результаты свидетельствуют в пользу формирования крайне неустойчивого интерфейса димеризации в структуре В7ACD или о невозможности его образовывать вовсе. Таким образом, замены аминокислот на ключевых позициях в первичных структурах В7ACD и В8ACD, а также необычное строение их $\beta 7$ складок приводят к неспособности этих ACD формировать устойчивую димерную структуру.

Полученные результаты позволили разделить ACD пяти исследуемых малых белков теплового шока на две группы. К первой группе относятся α -кристаллиновые домены HspB1, HspB5 и HspB6, способные формировать димеры, а ко второй группе – α -кристаллиновые домены HspB7 и HspB8, остающиеся в мономерной форме в растворе. Охарактеризовав строение ACD разных малых белков теплового шока, мы приступили к изучению взаимодействия изолированных α -кристаллиновых доменов с полноразмерными малыми белками теплового шока.

3. Влияние N-концевого домена на встраивание α -кристаллиновых доменов в состав олигомеров полноразмерных малых белков теплового шока

Изолированные ACD удобны для исследования встраивания субъединиц в комплексы малых белков теплового шока тем, что отсутствие у них N- и C- концевых участков значительно упрощает интерпретацию результатов таких опытов. Малые белки теплового шока HspB1, HspB5 и HspB6 часто одновременно экспрессируются в некоторых органах и тканях и способны формировать гетероолигомерные комплексы [103]. При этом HspB1 и HspB5 образуют крупные олигомеры [166, 50], в то время как HspB6 в растворе формирует только небольшие олигомеры

[117]. Возможность формирования гетероолигомерных комплексов между HspB7 и HspB8, а также с другими sHsp была отмечена в нескольких работах, однако детали строения и состава таких гетероолигомеров практически не были исследованы [120, 121, 103]. В нашей работе мы анализировали, каким образом происходит процесс включения ACD HspB1, HspB5 и HspB6 в состав олигомеров, образованных полноразмерными малыми белками теплового шока, а также оценивали возможность формирования гетероолигомеров между B7ACD, B8ACD и различными полноразмерными sHsp.

Взаимодействие крупных комплексов полноразмерных HspB1 и HspB5 с разными ACD можно анализировать методом гель-фильтрации, так как молекулярные массы олигомеров HspB1 и HspB5 сильно отличаются от молекулярной массы анализируемых ACD, причем эффективность включения ACD в состав гетероолигомеров также можно контролировать, анализируя состав хроматографических фракций методом SDS-электрофореза. Инкубация B1ACD, B5ACD и B6ACD с полноразмерными HspB1 (рис. 17 А-В) или HspB5 (рис. 17 Г-Е) не приводила к формированию совместного комплекса двух белков на профиле гель-фильтрации. Кроме того, при анализе фракций крупных комплексов в их составе не обнаруживались полосы, соответствующие ACD. Тем не менее, при добавлении ACD к полноразмерным белкам во всех случаях наблюдались небольшие изменения в поведении крупных олигомеров. Так пики элюции крупных комплексов были несколько уширены и смещены в сторону больших объемов элюции. По всей видимости, отсутствие N- и C-концевых последовательностей у α -кристаллиновых доменов не позволяет им эффективно включаться в состав крупных олигомерных комплексов, образованных полноразмерными HspB1 и HspB5. Вероятнее всего субъединицы ACD лишь слабо (транзиентно) взаимодействуют с крупными мультимерами или слабо конкурируют с полноразмерными субъединицами за включение в комплекс. В условиях гель-фильтрации равновесие реакции присоединения ACD к крупному олигомеру смещается в сторону диссоциации ACD. Эти факторы изменяют гидродинамические свойства олигомеров, что приводит к небольшой задержке мультимеров на колонке. Наиболее сильное взаимодействие наблюдалось между полноразмерным HspB1 и B5ACD. В этом случае мы детектировали присутствие небольшого количества ACD во фракциях олигомерного комплекса (рис. 17 Б), однако, количество связанного B5ACD было крайне мало, что не приводило к разрушению крупного комплекса. Также в случае взаимодействия между HspB1 и B1ACD небольшое количество полноразмерного белка детектировалось во фракциях, соответствующих пику B1ACD (рис. 17 А). Так как α -кристаллиновый домен HspB1 формирует наиболее прочный интерфейс димеризации (рис. 14 А), можно предположить, что в растворе происходит формирование димеров, состоящих из полноразмерного белка и его α -кристаллинового домена, которые, однако, не включаются в состав крупного комплекса.

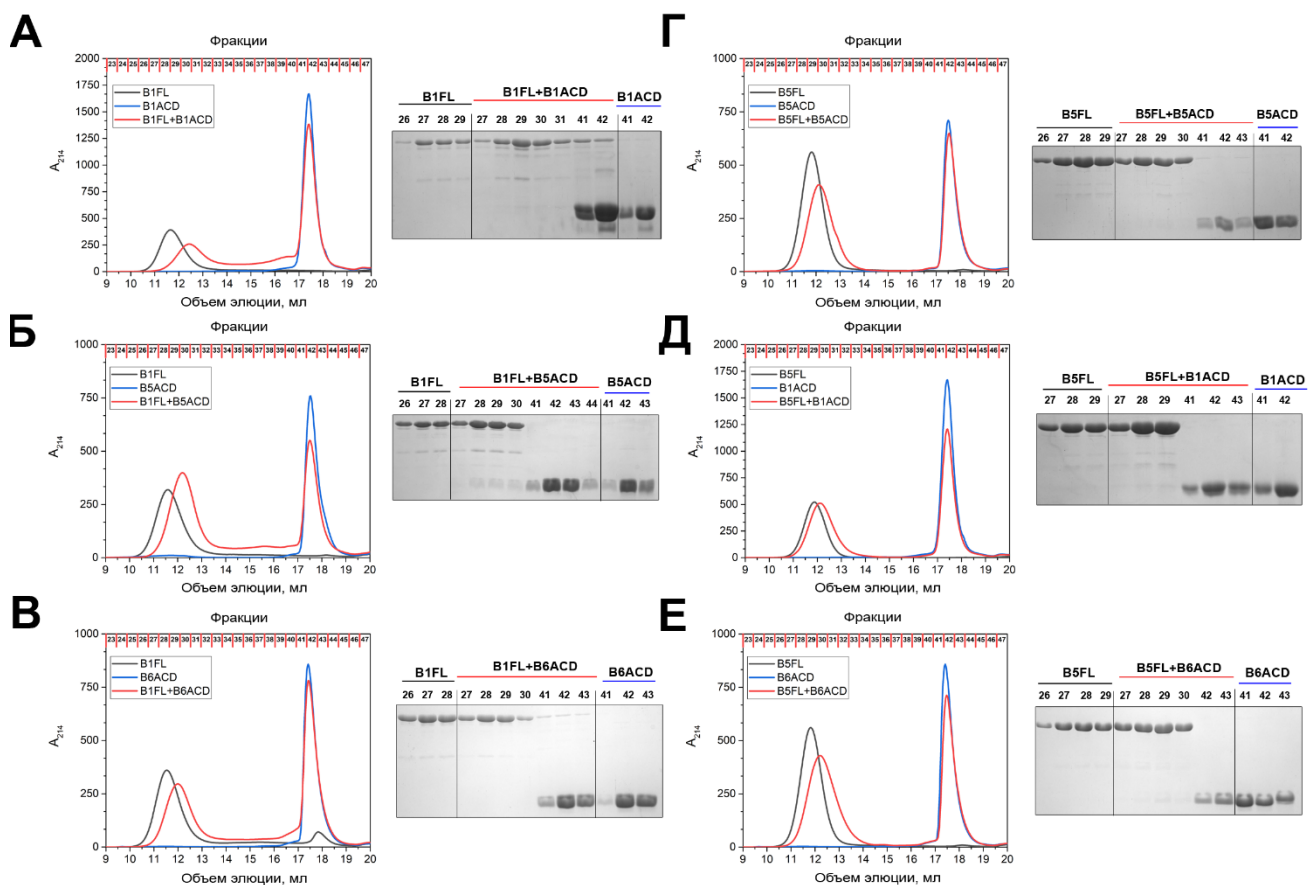


Рис. 17. Взаимодействие B1ACD, B5ACD и B6ACD с крупными олигомерами HspB1 (A-B) и HspB5 (Г-Е). На представленных панелях профили элюции изолированного полноразмерного HspB1 (B1FL) или HspB5 (B5FL) отмечены черной линией, изолированных ACD – синей линией, а их смесь, инкубированная при 42°C – красной линией. Состав фракций расположен справа у каждой их панелей. Номера фракций, указанные на хроматограммах, соответствуют номерам над электрофореграммами.

Невозможность эффективного включения ACD в состав крупных олигомеров вероятнее всего связана с наличием многоточечных и более прочных межмолекулярных контактов между полноразмерными субъединицами в составе олигомера не только за счет взаимодействия между ACD мономеров, но и за счет других дополнительных взаимодействий их N- и C-концевых доменов [68, 61]. В лаборатории Клевит (R.E. Klevit) был предложен механизм, описывающий встраивание HspB6 в крупные комплексы, образованные HspB5. Было постулировано, что в начале процесса HspB6 связывается своей гидрофобной канавкой, образованной $\beta 4/\beta 8$ складками, с IxI-мотивом, расположенным в C-концевом домене HspB5 [61]. Полученные нами данные согласуются с предложенной моделью и позволяют выдвинуть предположение, что приходящие в комплекс субъединицы и в том числе ACD улавливаются C-концевыми доменами мономеров, входящих в состав крупных олигомеров. Однако, отсутствие NTD в составе α -кристаллиновых доменов делает невозможным прочное встраивание изолированных α -кристаллиновых доменов в состав крупного олигомера.

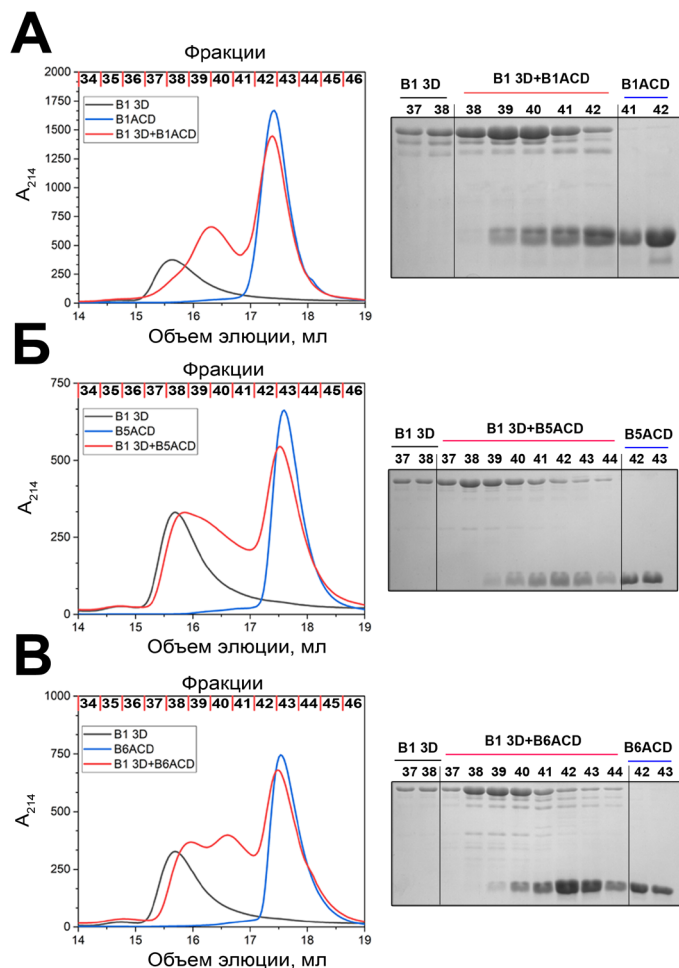


Рис. 18. Взаимодействие B1ACD (А), B5ACD (Б) и B6ACD (В) с 3D мутантом HspB1. На хроматограммах указаны профили элюции HspB1 3D (черная линия), ACD (синяя линия) и их эквимольной смеси (красная линия). Сканы гелей после анализа фракций представлены справа от каждой из хроматограмм. Номера над электрофореграммами соответствуют номерам анализируемых фракций.

методом аналитической гель-фильтрации (рис. 18). Во всех трех случаях мы наблюдали изменение профилей элюции, вызванное формированием гетерокомплексов. Кроме того, во фракциях, соответствующих пику гетерокомплекса, одновременно присутствовали как HspB1 3D, так и ACD (рис. 18 А-В). Таким образом, анализируемые α -кристаллиновые домены (B1ACD, B5ACD и B6ACD) эффективно взаимодействуют и встраиваются в четвертичную структуру малых олигомеров, образованных 3D мутантом HspB1 (рис. 18 А-В).

Представленные данные свидетельствуют о том, что N-концевой домен крупных олигомеров играет важную роль в стабилизации этих олигомеров и ограничивает включение новых субъединиц и изолированных α -кристаллиновых доменов в состав олигомера. Фосфорилирование (или мутации, имитирующие фосфорилирование) ослабляет взаимодействие

клетке прочность межмолекулярных контактов между N-концевыми доменами внутри олигомеров sHsp может регулироваться за счет посттрансляционных модификаций. Например, фосфорилирование остатков Ser15, Ser78 и Ser82 в N-концевом домене HspB1 (рис. 7 А) сопровождается диссоциацией крупного олигомера и образованием малых олигомеров, представленных димерами или тетрамерами [77]. Аналогичного дестабилизирующего эффекта можно добиться, заменяя остатки серина на остатки аспарагиновой кислоты [167]. Введение отрицательного заряда имитирует фосфорилирование и также приводит к диссоциации олигомера [50]. Мы проанализировали взаимодействие α -кристаллиновых доменов с так называемым 3D мутантом HspB1, в котором три указанных остатка серина заменены на остатки аспарагиновой кислоты (рис. 12 А). Смеси HspB1 3D с B1ACD, B5ACD или B6ACD инкубировали и анализировали

N-концевых доменов, дестабилизирует крупные олигомеры и способствует встраиванию изолированных кристаллиновых доменов в состав таких сравнительно малых олигомеров.

В некоторых тканях (например, в скелетной или сердечной мышце) вместе с HspB1, HspB5 и HspB6 совместно экспрессируются также HspB7 и HspB8. Поэтому мы анализировали возможность взаимодействия B7ACD и B8ACD с полноразмерными HspB1 (Приложение 4), HspB5 (Приложение 4) и HspB6 (Приложение 4), однако во всех случаях методом аналитической гель-фильтрации нам не удалось детектировать каких-либо изменений в профилях элюции, которые можно было бы интерпретировать, как белок-белковые взаимодействия. Как было показано выше, дестабилизированный HspB1 3D эффективно взаимодействует с B1ACD, B5ACD и B6ACD (рис. 18 А-В). Поэтому возможность формирования гетерокомплексов HspB1 3D с B7ACD или B8ACD также исследовали методом аналитической гель-фильтрацией. Во всех случаях нам не удалось обнаружить формирование гетерокомплексов между B7ACD или B8ACD и HspB1 3D (рис. 19 А и Б). По мере прохождения по гель-фильтрационной колонке образцы белков испытывают постоянное разведение, что может смещать равновесие комплексообразования в сторону исходных веществ. В качестве дополнительного метода для исследования взаимодействий между sHsp и ACD нами был также использован метод нативного электрофореза, при проведении которого наоборот происходит концентрирование препарата белка. Такой подход удобно применять для белков с различающимися молекулярными массами и значениями pI. В случае формирования комплекса между белками на электрофореграмме возникает полоса с промежуточной электрофоретической подвижностью (рис. 19 В). Так, например, в случае взаимодействия между HspB1 3D и α -кристаллиновым доменом HspB6 наблюдается убывание полосы полноразмерного белка и появление промежуточной полосы, соответствующей гетерокомплексу (рис. 19 В). Применение этого ортогонального метода для исследования гетероолигомеризации между B7ACD, B8ACD и HspB1 3D также показало, что устойчивого комплекса между этими белками не формируется (рис. 19 Г и Д). Таким образом α -кристаллиновые домены HspB7 и HspB8 либо слабо взаимодействуют с крупными комплексами, либо вовсе не способны образовывать с ними гетероолигомеры.

Проведенные эксперименты показывают, что включение субъединиц в состав олигомеров малых белков теплового шока и формирование гетерокомплексов является многофакторным и комплексным процессом. Как было показано на первом этапе наших исследований, 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. Причины отсутствия гетерокомплексов между двумя ортологичными малыми белками теплового шока HSP18.1 и HSP17.7 из посевного гороха (*Pisum*

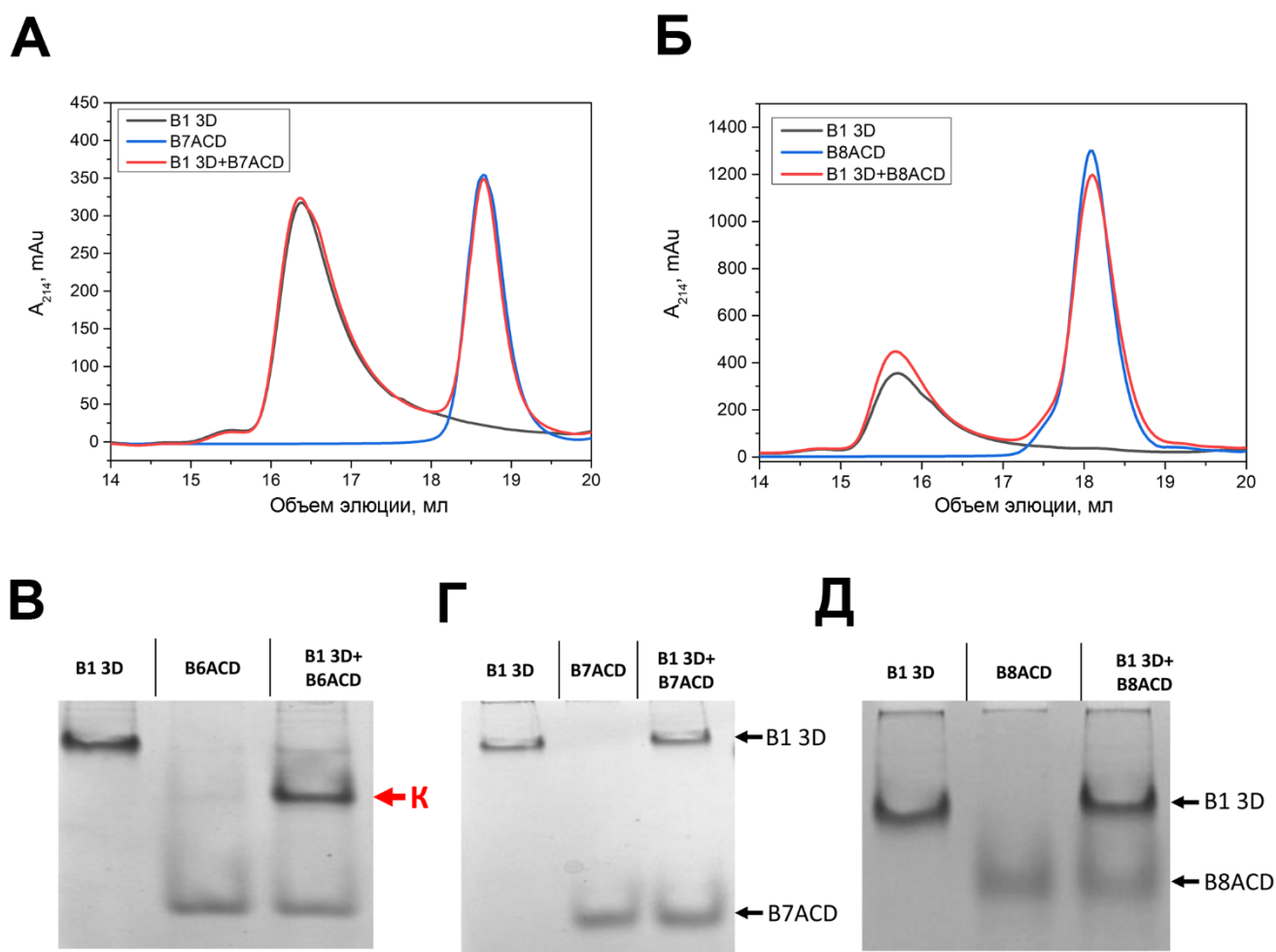


Рис. 19. Исследование взаимодействия HspB1 3D с B7ACD (А) или B8ACD (Б) методом аналитической гель-фильтрации. На хроматограммах приведены профили элюции HspB1 3D (черная линия), ACD (синяя линия) и их эквимоллярные смеси (красная линия). Исследование взаимодействия HspB1 3D с B6ACD (В), B7ACD (Г) или B8ACD (Д) методом нативного электрофореза. При формировании комплекса между белками формируется полоса с промежуточной электрофоретической подвижностью (красная стрелка с пометкой К). Положение белков на электрофореграммах указано стрелками.

sativum) были недавно подробно исследованы в лаборатории Вирлинг (E. Vierling) [59]. Так было показано, что именно различия в интерфейсах димеризации α -кристаллиновых доменов двух sHsp не позволяют им формировать устойчивые гетерокомплексы. В совокупности полученные результаты свидетельствует, что эволюционное расхождение между группой (HspB1, HspB5, HspB6) и группой (HspB7, HspB8) на уровне α -кристаллиновых доменов приводит к нарушению гетероолигомеризации между этими ортологичными белками, ко-экспрессирующимися друг с другом.

На следующем этапе мы перешли к более сложной экспериментальной модели, предполагающей изучение гетероолигомеризации между полноразмерными белками, и попытались найти наиболее важные для этого процесса последовательности в N-концевом домене. Среди представителей семейства sHsp человека многие белки содержат в структуре

своих N-концевых доменов консервативный мотив sRLFDQxFG, функциональная роль которого до последнего времени оставалась мало изученной.

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

N-концевой домен малых белков теплового шока участвует в построении олигомерной структуры sHsp [78, 97, 72, 71, 68], влияет на процессы гетероолигомеризации между ними [119, 118, 61], а также может принимать участие в регуляции шапероноподобной активности [47, 97, 78]. В структуре переменного N-концевого домена многих малых белков теплового шока человека обнаруживается небольшой консервативный участок, обозначаемый как sRLFDQxFG мотив [1]. В нашей работе мы подробно анализировали роль первых пяти аминокислотных остатков SRLFD и наиболее консервативного среди них аминокислотного остатка аргинина в процессах гомо- и гетероолигомеризации трех малых белков теплового шока (HspB1, HspB5, HspB6). Для этого нами были получены мутантные формы этих белков, содержащих делецию пентапептида SRLFD из консервативного мотива, а также мутантные формы этих белков с заменой консервативного аргинина на остаток аланина (рис. 12 Б).

В первую очередь мы анализировали влияние указанных мутаций на олигомерное строение HspB1, HspB5 и HspB6. В согласии с данными литературы [25, 31, 32, 33] аналитическая гель фильтрация препаратов белков дикого типа свидетельствует о том, что HspB1 и HspB5 в растворе формируют стабильные олигомеры [168, 97], с кажущейся молекулярной массой 530-600 (рис. 20 А) и 510-550 кДа (рис. 20 Г) соответственно. Четвертичная структура этих олигомеров стабильна в широком диапазоне концентраций белка, наносимого на колонку. HspB6 в свою очередь представлен в растворе малыми олигомерами (димерами) с кажущейся молекулярной массой 58 кДа (рис. 20 Ж), обладающими слабо выраженной тенденцией к самоассоциации при увеличении концентрации наносимого белка, что также согласуется с данными литературы [47, 117].

Точечная замена R/A в структуре HspB1 приводит к частичной диссоциации крупных комплексов и появлению нового пика олигомеров с молекулярной массой 90 кДа (рис. 20 Б). Делеция консервативного пентапептида вызывает более выраженный эффект, приводя практически к полной диссоциации крупных комплексов (рис. 20 В).

Точечная замена R/A в случае HspB5 приводила к уменьшению кажущейся молекулярной массы олигомеров, однако не вызывала диссоциации олигомеров при разведении (рис. 20 Д). В

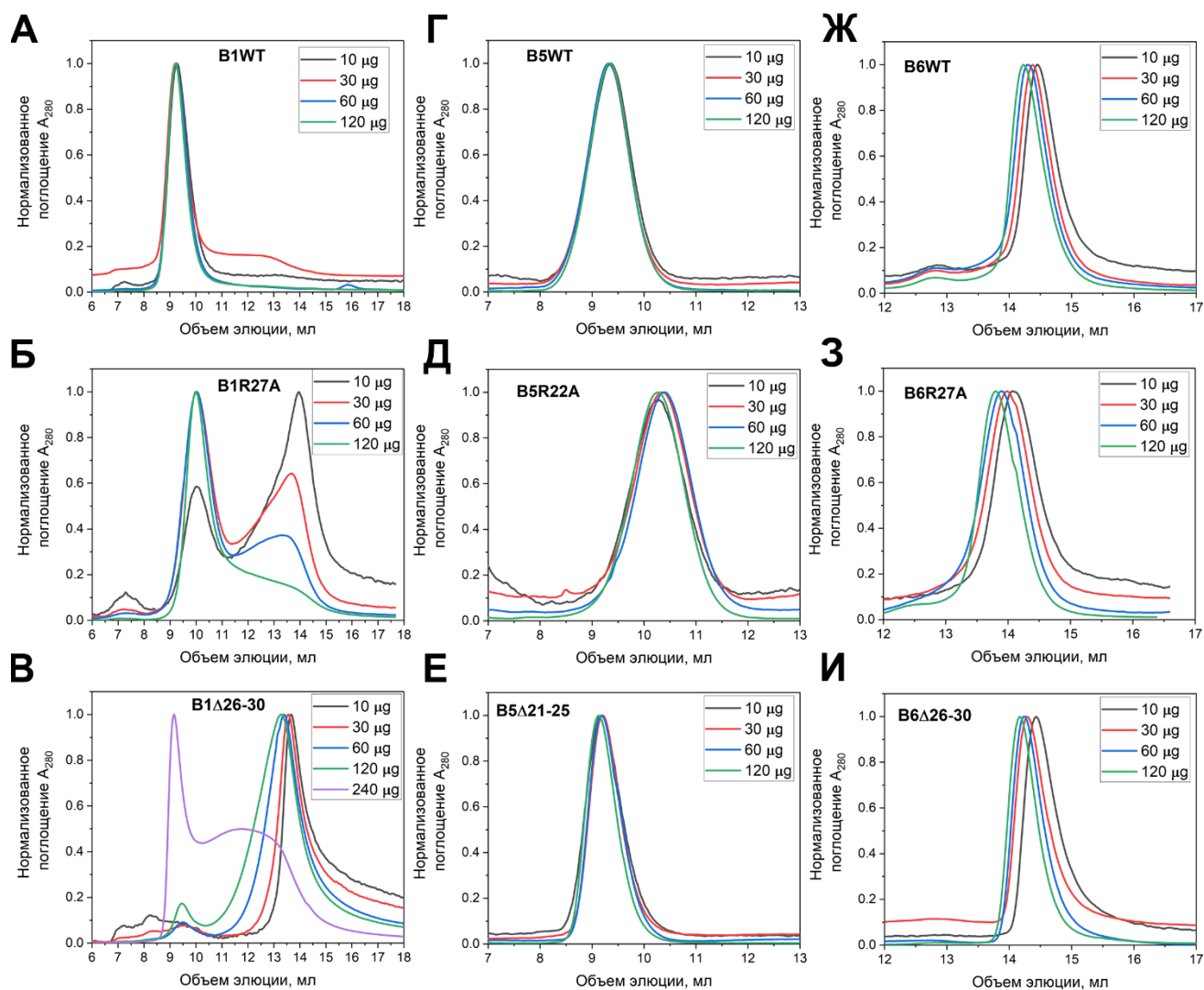


Рис. 20. Влияние точечной замены R/A и делеции первых пяти аминокислот в консервативном sRLFDQxFG мотиве на четвертичную структуру HspB1, HspB5 и HspB6. Профили аналитической гель-фильтрации HspB1, HspB5 и HspB6 дикого типа указаны на панелях **А**, **Г**, **Ж**; их точечных мутантов R/A - на панелях **Б**, **Д**, **З**; делеционных мутантов - на панелях **В**, **Е**, **И** соответственно. Количество наносимого на колонку белка указано на каждой из панелей на врезке.

случае делеции консервативного пентапептида изменений в положении пика элюции не наблюдалось, в то же время такие формы белка элюировались в более узких пиках, что, вероятно, связано с уменьшением полидисперсности образца (рис. 20 Е). Полученные данные указывают на то, что олигомеры HspB5 значительно более стабильны по сравнению с олигомерами HspB1.

Четвертичная структура HspB6 также не претерпевала изменений как при введении точечной замены R/A, так и при введении делеции и оставалась на уровне кажущихся молекулярных масс, соответствующих димеру (рис. 20 З, И).

Полученные данные об олигомерном строении sHsp, содержащих мутации и делеции в консервативном мотиве, 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. Следует отметить, что замена остатка Arg на Ala, приводящая

к уменьшению положительного заряда, сопровождается изменением в четвертичной структуре во многом аналогичным действием фосфоимитирующих мутаций или фосфорилированию определенных остатков в N-концевом домене. Как уменьшение положительного заряда, вызванное заменой Arg/Ala, так и увеличение отрицательного заряда, вызванное фосфорилированием или фосфоимитирующими мутациями, сопровождается ослаблением межсубъединичных контактов в крупных олигомерах HspB1 и HspB5 и приводит либо к почти полной диссоциации крупных олигомеров HspB1, либо к уменьшению размеров олигомеров в случае HspB5.

На следующем этапе работы мы анализировали, какое влияние могут оказывать мутации в sRLFDQxFG мотиве на процессы гетероолигомеризации между HspB1/HspB6 и HspB5/HspB6. В согласии с опубликованными ранее данными [118, 119, 105] инкубация смеси HspB1 и HspB6 диких типов при 42 °C приводит к формированию гетерокомплексов, элюирующихся на профиле гель-фильтрации в виде двух мажорных пиков с кажущимися молекулярными массами равными 100 и 300 кДа (рис. 21 А и Г). По данным электрофореза белковой фракции на протяжении всего профиля элюции соответствовал молярному соотношению между HspB1 и HspB6 равному единице (рис. 21 А и Г). В контрольном эксперименте мы инкубировали смесь белков при 4 °C, замедляя таким образом процесс обмена между субъединицами. Как и следовало ожидать, в этом случае гетероолигомерные комплексы не образовывались (рис. 21 А и Г). Как уже отмечалось, точечная мутация R/A или полная делеция консервативного пентапептида 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. 21 А, Б, В). В данном случае дестабилизация N-концевого домена крупных комплексов HspB1, как и в эксперименте с HspB1 3D многократно упрощает процесс включения новых субъединиц в гетерокомплекс, снижая энергетический порог межсубъединичного взаимодействия. Внесение аналогичных мутаций в структуру sRLFDQxFG мотива HspB6 оказывает прямо противоположное влияние на способность этого белка образовывать гетероолигомеры с HspB1. Действительно, внесение делеции или точечной мутаций R/A не оказывает существенного влияния на четвертичную структуру HspB6 (рис. 20 З, И), но заметно уменьшает вероятность формирования гетероолигомеров с HspB1 (рис. 21 Д, Е). Так, при низких температурах HspB1 дикого типа не формирует гетерокомплексов с мутантными формами HspB6. Нарушение включения субъединиц HspB6 с модифицированными N-концевыми доменами наблюдается и при 42 °C. При этом мутантные формы HspB6 практически не включаются в структуру крупных гетероолигомеров, что приводит к изменению соотношения

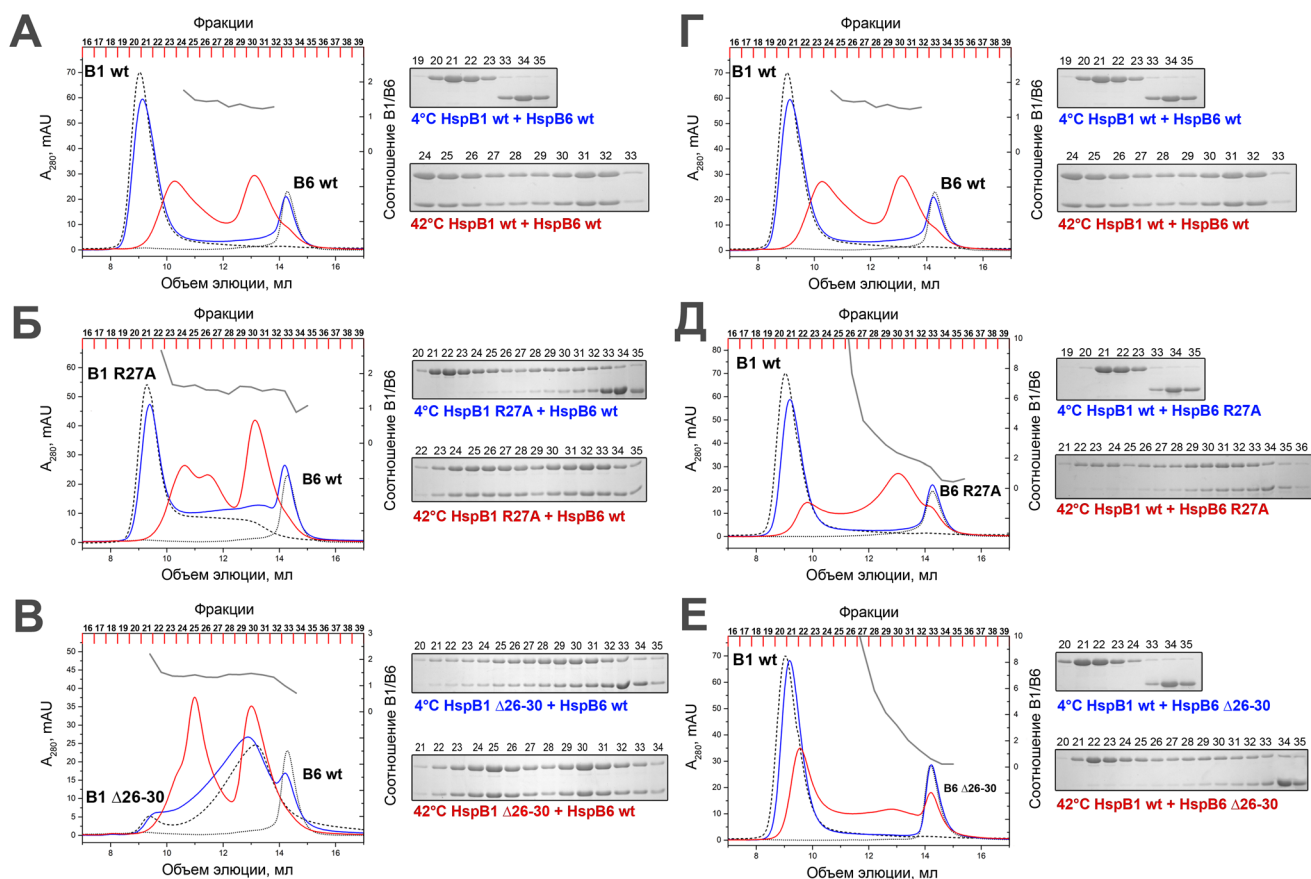


Рис. 21. Исследование олигомерной структуры гетероолигомерных комплексов HspB1/HspB6 методом гель-фильтрации. На панелях изображены профили элюции изолированных белков и их смесей, преинкубированных при 4°C или 42°C. На левой оси отмечено изменение оптической плотности при 280 нм, на правой оси отмечено 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, номера которых показаны на профилях элюции. 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.

субъединиц на всем протяжении профиля элюции (рис. 21 Д, Е). Такое поведение может быть обусловлено тем, что мутированный N-концевой домен HspB6 менее прочно взаимодействует с немодифицированными N-концевыми доменами в крупном олигомере HspB1 дикого типа и поэтому такие субъединицы не могут эффективно встраиваться в гетероолигомерный комплекс.

Мы также проводили сравнение эффекта от удаления положительного заряда при замене аргинина на аланин с эффектом введения дополнительного отрицательного заряда в N-концевой домен при фосфорилировании. Остаток Ser16 в N-концевом домене HspB6 располагается в непосредственной близости от sRLFDQxFG мотива и в определенных условиях подвергается фосфорилированию под действием PKA [19]. При анализе комплексообразования между HspB1 и HspB6, фосфорилированного по остатку Ser16, мы получили результаты качественно схожие с эффектом от мутации HspB6R27A (рис. 21 Д). Фосфорилирование обладало более мягким

эффектом и по сравнению с точечной мутацией и не вызывало нарушения включения субъединиц HspB6 в состав гетерокомплексов (рис. 22). Тем не менее введение дополнительного отрицательного заряда приводило снижению представленности HspB6 в составе крупных комплексов, нарушению их стехиометрии, и увеличению количества гетерокомплексов с малыми кажущимися молекулярными массами.

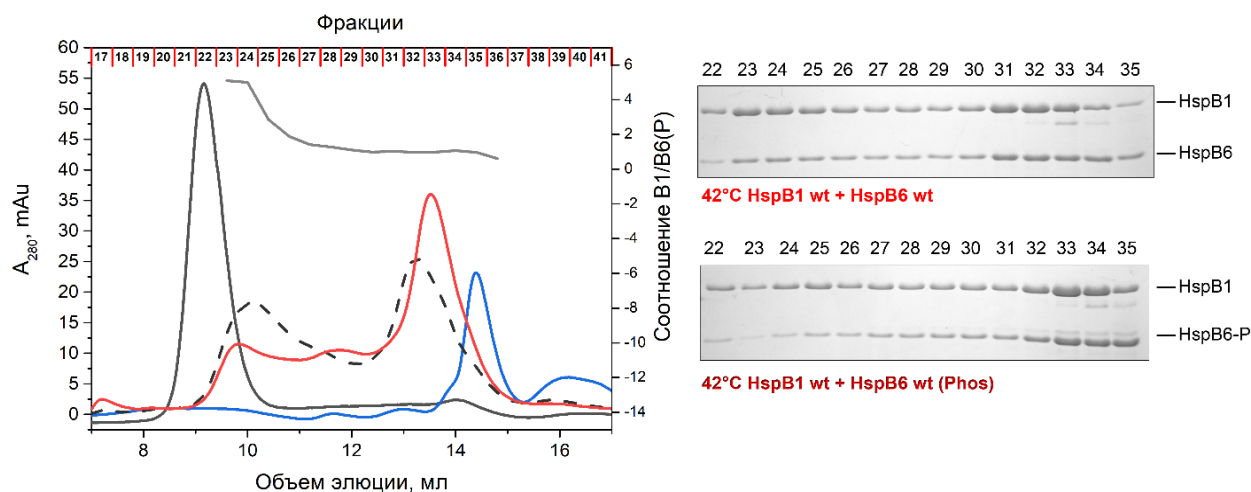


Рис. 22. Исследование олигомерной структуры гетероолигомерных комплексов HspB1/HspB6-P методом гель-фильтрации. На левой оси отмечено изменение оптической плотности при 280 нм, на правой оси отмечено соотношение HspB1/HspB6-P, в каждой из фракций, полученных при хроматографии смесей двух белков, преинкубированных при 42 °С. Рядом с панелями во врезках показаны результаты электрофоретического анализа фракций HspB1/HspB6 и HspB1/HspB6-P, где номера дорожек соответствуют номерам фракций над профилями элюции. Серой прерывистой линией обозначен профиль элюции HspB1 и нефосфорилированного HspB6, серой линией – HspB1, синей линией – HspB6-P, красной линией – смеси HspB1 и HspB6-P, серой линией над профилями элюции – отмечено соотношение HspB1/HspB6-P во фракциях.

В нашей работе мы также исследовали взаимодействие между HspB5 и HspB6. Процесс гетероолигомеризации между этими белками отличается от такового между HspB1 и HspB6. Данные литературы позволяли предположить, что в составе такого гетероолигомерного комплекса присутствуют как гетеродимеры HspB5/HspB6, так и гомодимеры HspB5 [106, 104]. При 4 °С HspB5 и HspB6 не способны формировать гетероолигомеров, а при инкубации при 42 °С эти белки формируют большой гетерокомплекс с кажущейся молекулярной массой в 400 кДа и соотношением субъединиц HspB5:HspB6 в среднем равным 2:1 (рис. 12 А и Г). Таким образом, приблизительно половина HspB6 остается в свободной форме и не встраивается в гетерокомплекс. Гомоолигомеры HspB5 очень стабильны и даже внесение указанных мутаций в sRLFDQxFG мотив лишь незначительно дестабилизируют такие комплексы (рис. 20 Д, Е). Вследствие этого HspB6 не приобретает способность встраиваться в такие комплексы при низкой температуре, однако при повышенной температуре гетерокомплексы, образованные мутантными

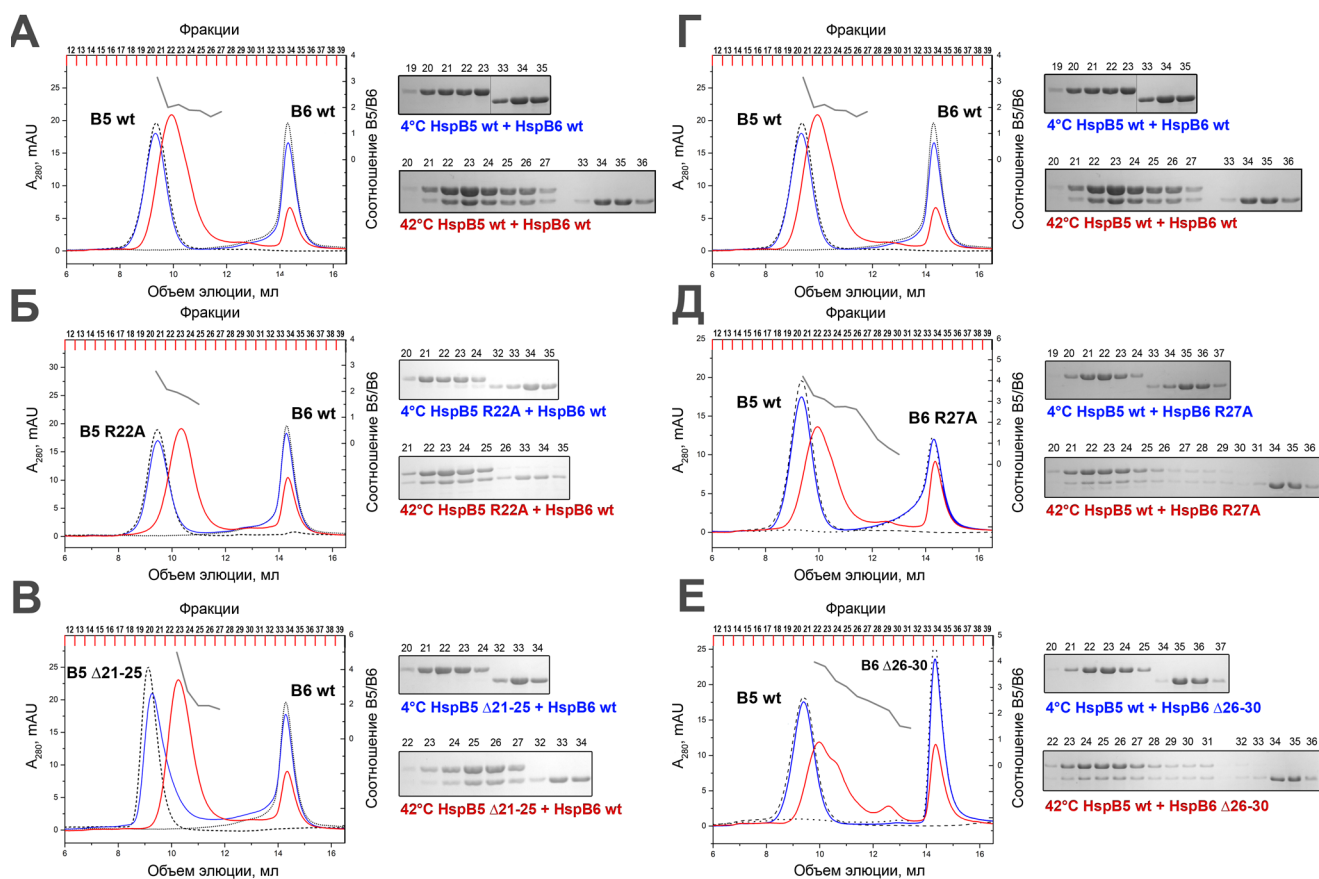


Рис. 23. Исследование олигомерной структуры гетероолигомерных комплексов HspB5/HspB6 методом гель-фильтрации. На панелях изображены профили элюции изолированных белков и их смесей, преинкубированных при 4 °С и 42 °С. На левой оси отложена величина оптической плотности при 280 нм, на правой оси - молярное соотношение HspB5/HspB6, в каждой из фракций, полученных при хроматографии смесей двух белков, преинкубированных при 42 °С. Рядом с панелями во врезках показаны результаты электрофоретического анализа фракций, номера которых показаны на профилях элюции. На отдельных панелях показаны результаты, полученные при анализе смесей следующих малых белков теплового шока HspB5WT/HspB6WT (А, Г), HspB5R22A/HspB6WT (Б), HspB5Δ21-25/HspB6WT (В), HspB5WT/HspB6R27A (Д), HspB5WT/HspB6Δ26-30 (Е). Черным пунктиром обозначен профиль элюции HspB6, черной прерывистой линией – HspB5, синей линией – профиль элюции смесей двух белков, инкубированные при 4°С; красной линией – смесей двух белков, инкубированных при 42 °С, серой линией – отмечено молярное соотношение HspB5/HspB6 во фракциях.

формами HspB5, обладают несколько меньшим размером по сравнению с комплексами, сформированными между HspB5 и HspB6 диких типов (рис. 23 Б, В). Точно также, как и в случае опытов с HspB1, мутации в N-концевом домене HspB6 уменьшают вероятность его встраивания в гетерокомплекс с HspB5, что отражается на стехиометрии гетероолигомеров и повышает их гетерогенность (рис. 23 Д, Е).

Завершая этот раздел, можно прийти к следующим заключениям. Уменьшение положительного заряда (путем замены R/A) в N-концевом домене или удаление пяти консервативных аминокислот в начале sRLFDQxFG мотива дестабилизирует N-концевой домен крупных олигомеров (рис. 24 А, Б) аналогично действию фосфорилирования или введению фосфоимитирующих мутаций. В случае HspB1 это облегчает формирование гетероолигомеров HspB1/HspB6 (рис. 24 А), а в случае HspB5 приводит к уменьшению размера гетерокомплекса

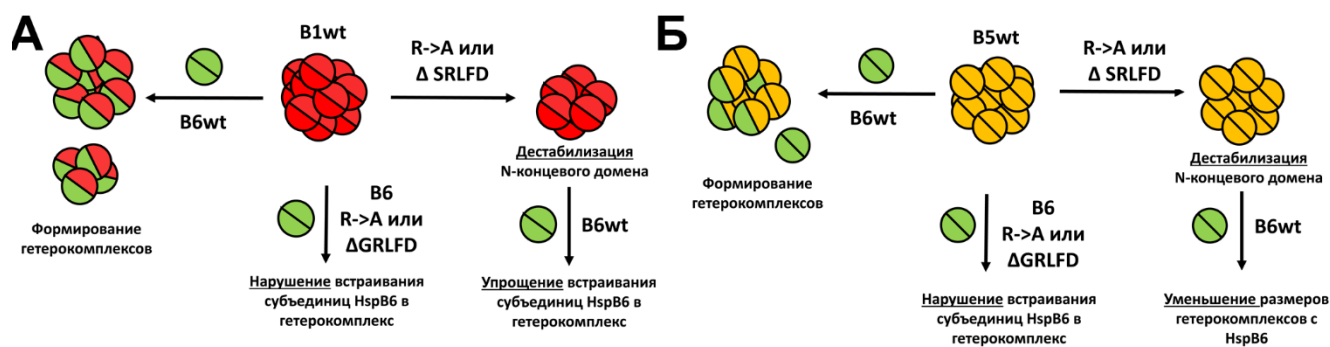


Рис. 24. Схема, иллюстрирующая роль N-концевого домена в процессе гетероолигомеризации малых белков теплового шока HspB1, HspB5 и HspB6 друг с другом. Мономеры HspB1, HspB5 и HspB6 показаны полукругами красного, желтого и зеленого цвета соответственно. Гомо- и гетеродимеры изображены, как целые кружки. HspB1 и HspB6 формируют гетерокомплекс с соотношением субъединиц 1:1 (А). HspB5 и HspB6 формируют гетерокомплекс с соотношением субъединиц 2:1 (Б). Мутации в N-концевом домене HspB1 приводят к дестабилизации крупных комплексов, что упрощает включение субъединиц HspB6. Мутации в N-концевом домене HspB5 в меньшей степени дестабилизируют крупные комплексы, что приводит к уменьшению размеров гетероолигомеров с HspB6. Мутации в N-концевом домене HspB6 нарушают процесс гетероолигомеризации как с HspB1, так и с HspB5.

HspB5/HspB6 (рис. 24 Б). 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 (рис. 24 А, Б).

Как бы то ни было, N-концевой домен HspB6 может существенным образом влиять на свойства этого белка. С этим заключением согласуются недавно опубликованные данные из лаборатории профессора Краниас (E. Kranias), свидетельствующие о том, что точечные мутации в N-концевом домене HspB6 коррелируют с развитием некоторых форм кардиомиопатий человека [135, 133]. Поэтому представлялось целесообразным проанализировать влияние этих недавно обнаруженных мутаций на физико-химические свойства HspB6 человека.

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

Некоторые врожденные заболевания человека сопряжены с мутациями в генах малых белков теплового шока [3]. Во многих случаях такие мутации носят точечный характер и локализуются в N-концевом домене. Например, точечные замены в первичной структуре N-концевого домена HspB1 и HspB3 сопряжены с развитием заболеваний относящихся к группе периферических невропатий (дистальная врожденная моторная невропатия и болезнь Шарко-Мари-Тута), а мутации в N-концевом домене αA- и αB-кристаллинов (HspB4 и HspB5) ассоциированы с развитием катаракты [18, 169, 3, 109]. Замены в N-концевом домене sHsp оказывают существенное влияние на физико-химические свойства мутантных форм белков,

изменяя их способность взаимодействовать с белками-субстратами и белками-партнерами [97, 110].

В сердечной и скелетной мышце человека экспрессируется малый белок теплового шока HspB6 [22, 170]. В его первичной структуре рядом с мотивом sRLFDQxFG были выявлены позиции, мутации в которых могут приводить к развитию кардиомиопатий. На сегодняшний день известно о двух мутациях, негативно влияющих на кардиопротекторные свойства HspB6. Первая замена S10F ассоциирована с развитием летальной перипартальной кардиомиопатии [133] и, по всей видимости, оказывает влияние на взаимодействие между HspB6 и адаптерным белком Beclin 1, нарушая процесс аутофагии в кардиомиоцитах [134]. Вторая замена P20L была обнаружена как у пациентов с кардиомиопатией, так и в популяции здоровых людей [135]. Влияние указанной мутации на кардиопротекторные свойства были исследованы в опытах на изолированной первичной культуре кардиомиоцитов крысы. При ишемии/реперфузии клеточной культуры экспрессия HspB6 дикого типа снижала долю кардиомиоцитов, переходящих к апоптозу, в то время как, экспрессия HspB6 P20L не оказывала защитного действия [135]. Для выявления молекулярных механизмов, лежащих в основе кардиопротекторных свойств HspB6, а также влияния точечных замен на функционирование этого белка, нам показалось целесообразным провести сравнение физико-химических свойств HspB6 дикого типа и двух его точечных мутантов.

Точечные замены серина на фенилаланин (S10F) или пролина на лейцин (P20L) располагаются в непосредственной близости от консервативного sRLFDQxFG мотива в N-концевом домене HspB6. Как было показано в предыдущем разделе, этот консервативный участок N-концевой последовательности необходим для правильного протекания процессов гетероолигомеризации с другими sHsp (HspB1 и HspB5). В ходе нашей работы мы исследовали влияние точечных замен в последовательности HspB6 на процессы взаимодействия с HspB1 и HspB5.

Как и белок дикого типа, мутантные формы HspB6 формировали гетероолигомерные комплексы с HspB1 или HspB5 только при повышенной температуре. В случае HspB1 взаимодействие с мутантными формами HspB6 приводило к образованию двух типов гетероолигомеров, где количество крупных комплексов с кажущейся молекулярной массой в 300 кДа было лишь немного выше по сравнению с комплексами, сформированными белками диких типов (рис. 25 А, Б, В). При этом стехиометрия субъединиц во всех исследованных случаях оставалась равной 1:1. Качественно схожие результаты были получены при исследовании гетероолигомеризации между мутантными формами HspB6 и HspB5. Как и в случае с HspB6

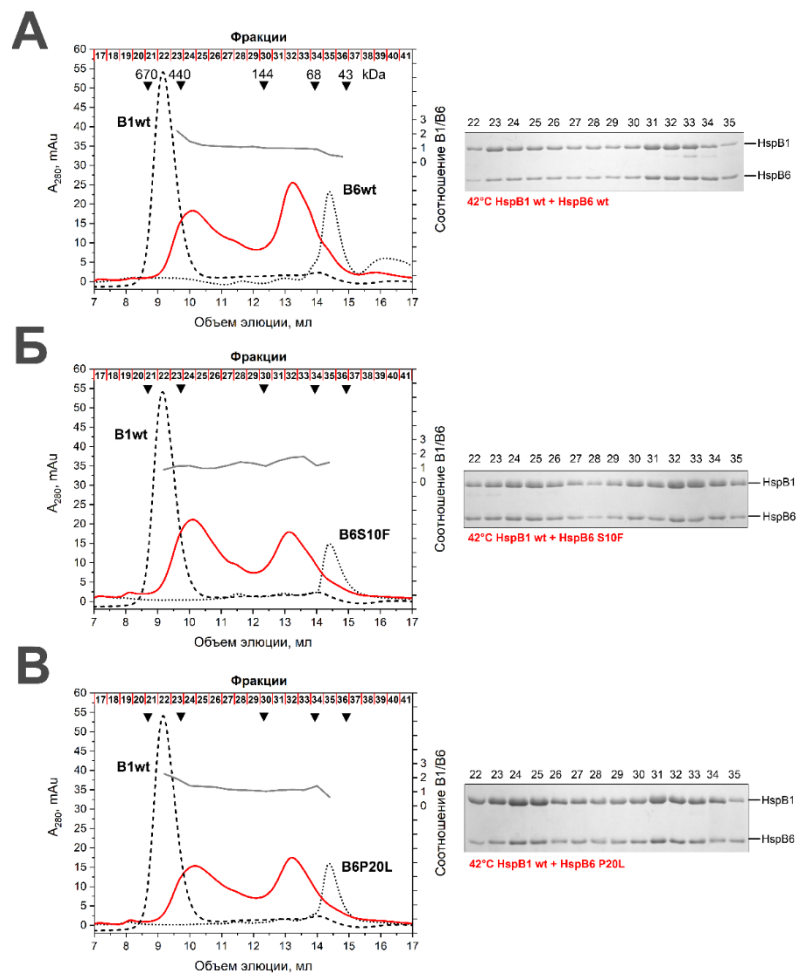


Рис. 25. Исследование олигомерной структуры гетероолигомерных комплексов HspB1/HspB6 методом гель-фильтрации. На панелях изображены профили элюции изолированных белков и их смесей, преинкубированных при 42 °С. На левой оси отложена величина оптической плотности при 280 нм, на правой оси - молярное соотношение HspB1/HspB6, в каждой из фракций, полученных при хроматографии смесей двух белков, преинкубированных при 42 °С. Рядом с панелями во врезках показаны результаты электрофоретического анализа фракций, номера которых указаны на профилях элюции. На отдельных панелях показаны результаты, полученные при анализе смесей следующих малых белков теплового шока HspB1WT/HspB6WT (А), HspB1WT/HspB6S10F (Б), HspB1WT/HspB6P20L (В). Черным пунктиром обозначен профиль элюции HspB6, черной прерывистой линией – HspB1, красной линией – смесей двух белков, инкубированных при 42 °С, серой линией – отмечено молярное соотношение HspB1/HspB6 во фракциях.

дикого типа мутантные формы не полностью включались в состав олигомера HspB5, формируя гетероконплекс с кажущейся молекулярной массой около 400 кДа (Приложение 5).

В N-концевом домене указанные точечные мутации S10F и P20L располагаются непосредственно на границах участка ¹⁰SWLRRASAPLP²⁰ (мутируемые остатки выделены жирным шрифтом, а Ser16 подчеркнут), содержащего участок фосфорилирования циклонуклеотид-зависимыми протеинкиназами (X-R-R-X-S-X) [171]. Фосфорилирование остатка Ser16 в N-концевом домене происходит в клетке при определенных физиологических условиях и позволяет HspB6 взаимодействовать с белком-адаптером 14-3-3 [127]. В литературе высказывается предположение, что точечные мутации могут нарушать процесс

фосфорилирования под действием протеинкиназы А (ПКА) и таким образом влиять на кардиопротекторную активность HspB6 [135]. Мы проанализировали влияние мутаций S10F и P20L на эффективность фосфорилирования HspB6 под действием ПКА, а также оценили взаимодействие таких фосфорилированных мутантных форм с белком-партнером 14-3-3.

Фосфорилирование HspB6 и его мутантных форм проводили *in vitro* под действием каталитической субъединицы ПКА. Методами электрофореза в присутствии мочевины (рис. 26 А) и радиоактивного счета было установлено, что при инкубации с ПКА HspB6 дикого типа и мутантная форма S10F полностью фосфорилируются за 40 минут, в то время как фосфорилирование мутантной формы P20L происходит с большей скоростью и уже к 20 минуте достигает максимума (рис. 26 Б). Изменение в скорости фосфорилирования при введении точечной мутации P20L может быть обусловлено увеличением сродства мутированной формы HspB6 к ПКА. Полученные данные находятся в определённом разногласии с ранее опубликованными результатами Nicolaou et al. [135], где было показано, что в клетке мутация P20L приводит к снижению эффективности фосфорилирования HspB6. При оценке степени фосфорилирования белка Nicolaou et al. пользовались методом вестерн-блоттинга с применением

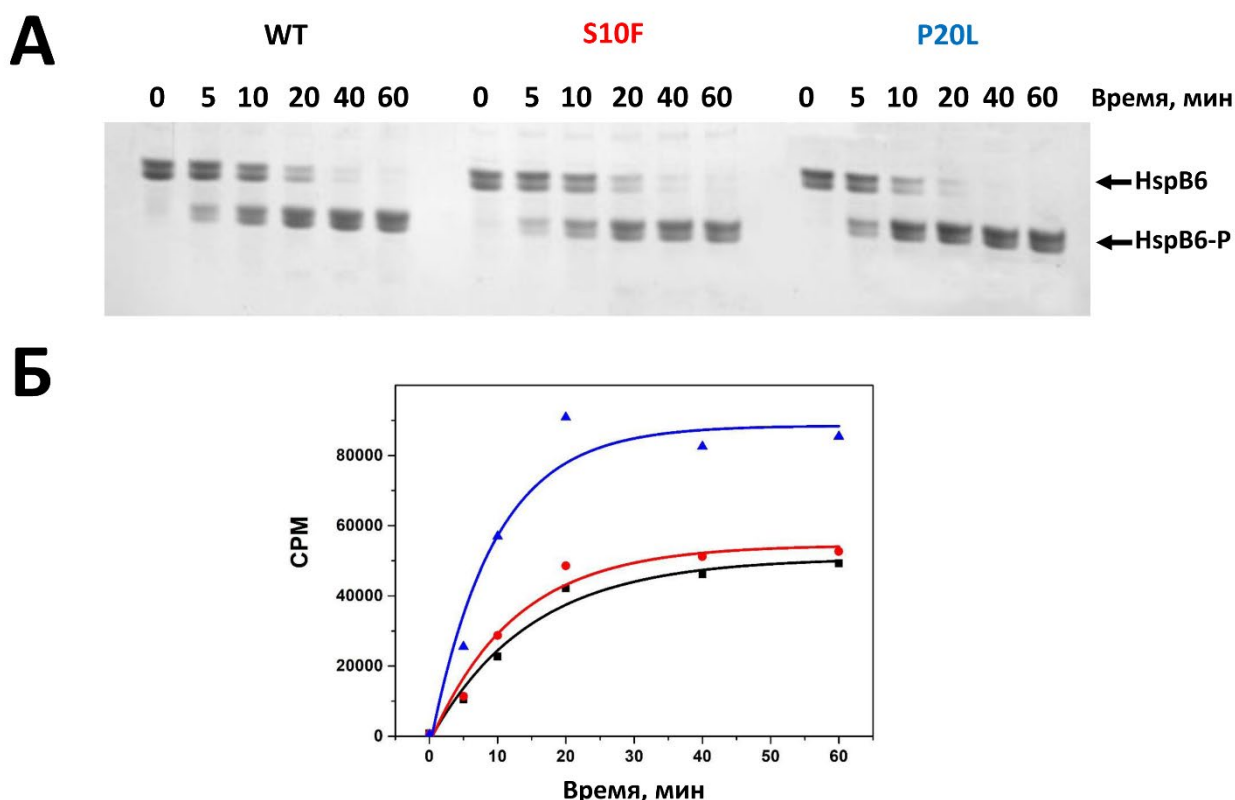


Рис. 26. Кинетика фосфорилирования HspB6 дикого типа и его мутантных форм каталитической субъединицей ПКА. **А.** Электрофорез в присутствии мочевины HspB6 дикого типа и его мутантных форм после инкубации с ПКА. Времена инкубации (мин) указаны на электрофореграмме над дорожками. Положения нефосфорилированной и фосфорилированной формы белка указаны стрелками. **Б.** Кинетика включения радиоактивного фосфата в состав HspB6 дикого типа (черные квадраты и черная линия), HspB6S10F (красные круги и красная линия) и HspB6P20L (синие треугольники и синяя линия). Полученные данные представляют средние значения трех независимых экспериментов.

поликлональных антител, отобранных на первой стадии очистки для узнавания нефосфорилированной последовательности SWLLRRASAPLPG, а на второй стадии очистки для узнавания фосфорилированной последовательности SWLLRRA-pS-APLPG [135]. При таком подходе к получению поликлональных антител для узнавания специфического участка фосфорилирования аффинность получаемых антител будет в значительной мере зависеть от аминокислотного контекста рядом с фосфорилируемым остатком серина. Точечная мутация P20L в непосредственной близости от Ser16 может снижать эффективность связывания данного фосфо-эпитопа поликлональными антителами. В нашей работе мы использовали прямые методы измерения скорости фосфорилирования и показали, что для мутантной формы P20L реакция фосфорилирования протекает эффективнее по сравнению с белком дикого типа.

Белок 14-3-3 взаимодействует преимущественно с фосфорилированными остатками серина, расположенными в специфическом аминокислотном контексте (один из участков узнавания для 14-3-3 имеет первичную структуру: R-X-X-pS-X-P) [130]. При фосфорилировании N-концевой домен HspB6 может взаимодействовать с 14-3-3, формируя прочный комплекс [127, 39]. Точечные мутации S10F и P20L могут влиять на прочность связывания HspB6 с 14-3-3, модулируя взаимодействие между двумя белками. При исследовании взаимодействия методом гель-фильтрации нам не удалось обнаружить различия в формировании комплекса между 14-3-3 и HspB6 дикого типа или его мутантными формами (Приложение 6). Указанные мутации, вероятно, всё же находятся на достаточном удалении от сайта узнавания белком 14-3-3 и поэтому не влияют на его взаимодействие с HspB6.

Таким образом точечные мутации S10F и P20L не влияют на взаимодействие HspB6 с HspB1 и HspB5, а также с клеточным партнёром 14-3-3, однако мутация P20L увеличивает скорость фосфорилирования HspB6 под действием ПКА, что может косвенно влиять на взаимодействие с 14-3-3 в клетке. Точечные мутации в N-концевой последовательности могут влиять не только на взаимодействие с белками-партнёрами, но и на физико-химические свойства самого HspB6. В ходе нашей работы мы провели сравнения поверхностной гидрофобности, термической стабильности, четвертичной структуры и шапероноподобной активности HspB6 дикого типа и его мутантных форм.

Замены серина на фенилаланин (S10F) или пролина на лейцин (P20L) могут приводить к изменению гидрофобных свойств N-концевого домена HspB6. Титрование HspB6 дикого типа гидрофобным зондом bis-ANS сопровождается небольшим увеличением флуоресценции, которая не достигает насыщения даже при высоких концентрациях гидрофобного зонда [47]. В свою очередь флуоресценция гидрофобного зонда существенно возрастает при взаимодействии с мутантными формами S10F и P20L, что свидетельствует в пользу того, что исследуемые

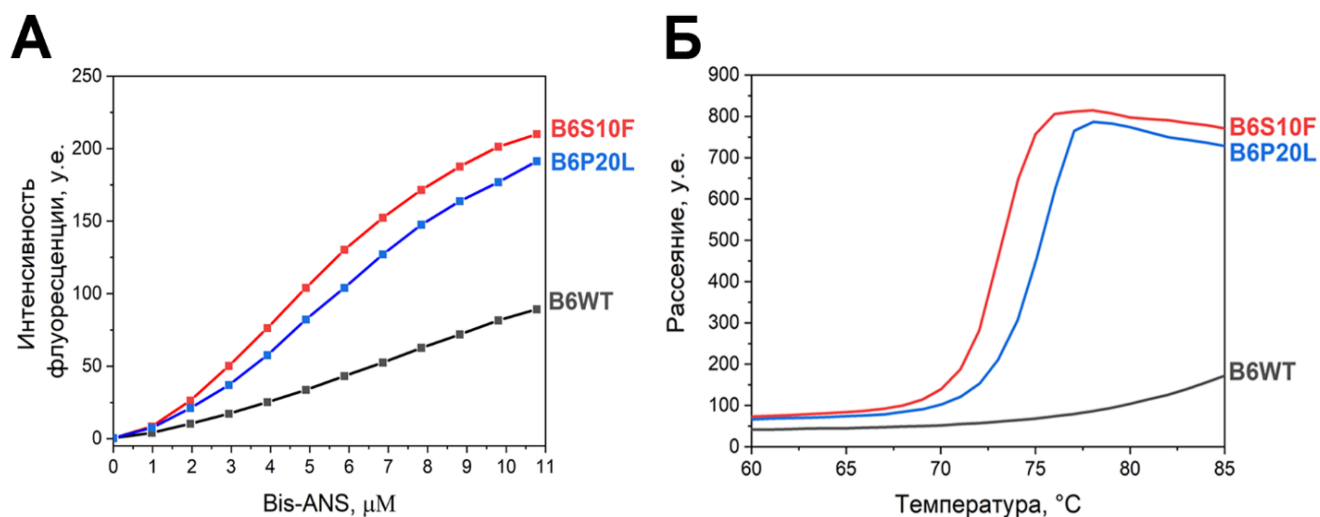


Рис. 27. Физико-химические характеристики препаратов HspB6 и его точечных мутантов S10F и P20L. **А.** Титрование препаратов гидрофобным зондом bis-ANS. **Б.** Влияние точечных мутаций на термоиндуцированную агрегацию HspB6. На графиках представлены усредненные результаты не менее трех экспериментов.

мутантные формы HspB6, действительно, обладают повышенной поверхностной гидрофобностью (рис. 27 А). Полученные результаты хорошо согласуются и с экспериментами по определению термической стабильности HspB6. Так мутантные формы S10F и P20L начинают агрегировать при нагревании уже при 70 $^{\circ}\text{C}$, в то время как HspB6 дикого типа практически не агрегирует и при более высоких температурах (рис. 27 Б). Изменение гидрофобности N-концевого домена может влиять не только на способность к агрегации при температурной денатурации, но и на способность молекул к самоассоциации при комнатной температуре. Известно, что HspB6 представлен в растворе в виде устойчивого димера, склонного к самоассоциации при высокой концентрации белка [117, 47]. В клетке белковые молекулы находятся в условиях краудинга, что может многократно усиливать способность белков к взаимодействию друг с другом. Мы проводили исследования четвертичной структуры HspB6 и его мутантных форм S10F и P20L в присутствии ТМАО (триметиламинооксида), имитирующего условия краудинга. В отсутствие ТМАО HspB6 и его точечные мутанты были представлены в виде димеров и их олигомерное состояние практически не изменялось при увеличении концентрации белка (рис. 28 А, Б, В). В тоже время при добавлении ТМАО HspB6 дикого типа проявлял слабую тенденцию к самоассоциации и оставался в основном в виде димеров (рис. 28 Г), в то время как анализируемые мутантные формы S10F и P20L были значительно более склонны к образованию высокомолекулярных комплексов (рис. 28 Д, Е). Таким образом, увеличение гидрофобности N-концевого домена приводит к усилению взаимодействий между молекулами HspB6, что провоцирует их самоассоциацию.

Характерной особенностью малых белков теплового шока является шапероноподобная активность. Под шапероноподобной активностью понимают способностью sHsp предотвращать

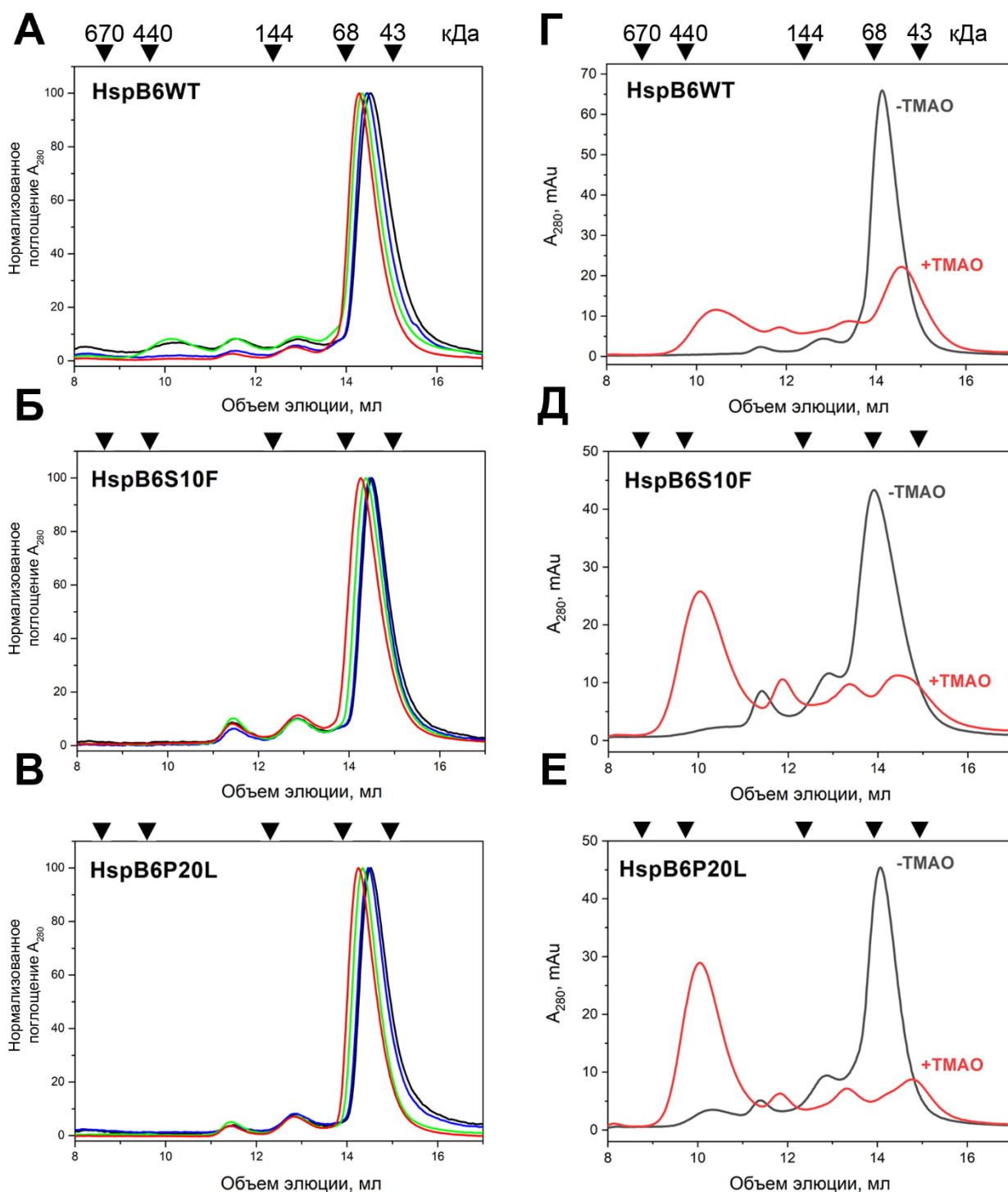


Рис. 28. Анализ четвертичной структуры HspB6 и его точечных мутантных форм. Аналитическая гель-фильтрация HspB6 дикого типа (А), его мутантных форм S10F (Б) и P20L (В) при разных концентрациях белка. На колонку в объеме 80 мкл наносили 20 мкг (черная кривая), 40 мкг (синяя кривая), 60 мкг (зеленая кривая) и 120 мкг (красная кривая) белка. Аналитическая гель-фильтрация HspB6 дикого типа (Г), его мутантных форм S10F (Д) и P20L (Е) в отсутствие ТМАО (-ТМАО, черная кривая) или в присутствии ТМАО (+ТМАО, красная кривая). Молекулярные массы белков стандартов указаны стрелками над каждой панелью.

аморфную агрегацию белков-субстратов. N-концевой домен малых белков теплового шока может принимать участие в шапероноподобной активности и ее регуляции [172, 4, 78]. Изменения физико-химических свойств HspB6 вследствие точечных мутаций в N-концевом домене может существенно влиять на проявление его шапероноподобной активности [47].

Поэтому в ходе нашей работы мы исследовали способность HspB6 дикого типа и его мутантных форм предотвращать агрегацию двух модельных белков, вызванную разными условиями. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) денатурирует при повышении температуры и впоследствии агрегирует, что сопровождается увеличением оптической плотности при 340 нм [21, 110]. Алкогольдегидрогеназа (АДГ) денатурирует также при повышенной температуре, но при условии одновременного восстановления дисульфидных связей в белке, что также приводит к увеличению оптической плотности [21, 47]. Дополнительно известно, что HspB6 дикого типа не проявляет шапероноподобной активности в отношении ГАФД и является хорошим шапероном для АДГ [21]. В согласии с предыдущими работами [21] нам не удалось обнаружить предотвращение агрегации ГАФД под действием HspB6 дикого типа (рис. 29 А). В тоже время

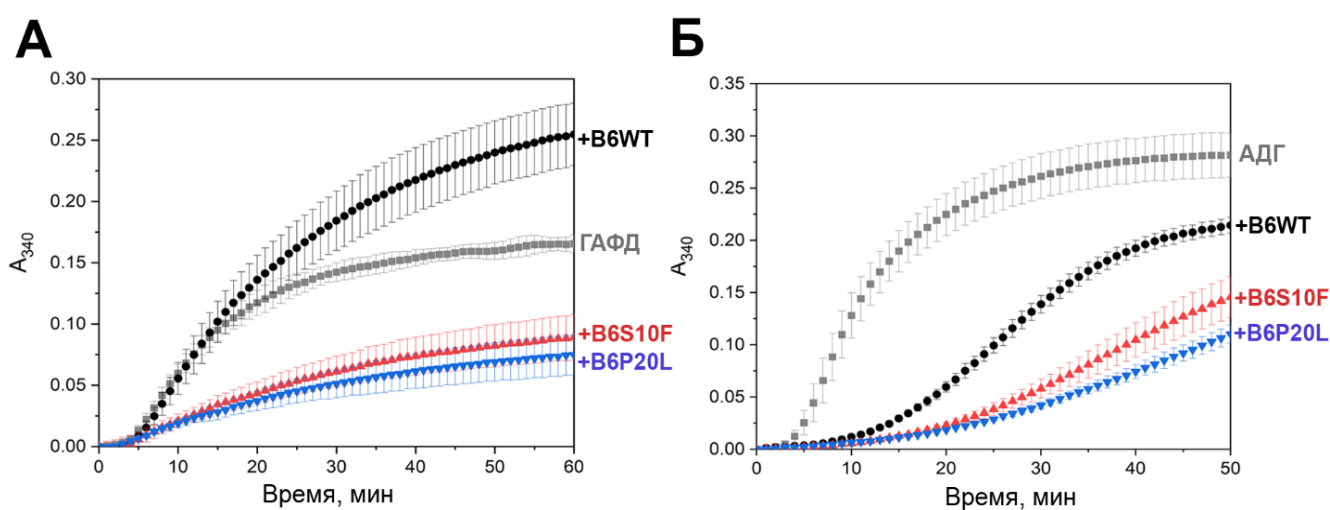


Рис. 29. Шапероноподобная активность HspB6 и его точечных мутантных форм. **А.** Кривые агрегации изолированного ГАФД (серые квадраты) и ГАФД в присутствии HspB6 дикого типа (черные кружки), мутантных форм S10F (красные треугольники) и P20L (синие треугольники). **Б.** Кривые агрегации изолированного АДГ (серые квадраты) и АДГ в присутствии HspB6 дикого типа (черные кружки), мутантных форм S10F (красные треугольники) и P20L (синие треугольники).

точечные мутантные формы S10F и P20L проявляли ярко выраженную шапероноподобную активность, снижая амплитуду оптической плотности (рис. 29 А). Во втором случае HspB6 дикого типа эффективно предотвращал агрегацию АДГ (рис. 29 Б), а точечные формы S10F и P20L обладали еще более выраженной шапероноподобной активностью, снижая амплитуду и увеличивая время начала агрегации (рис. 29 Б). Вероятно, в силу повышенной гидрофобности, HspB6 с точечными заменами S10F и P20L более эффективно связывается с денатурированными модельными субстратами, чем HspB6 дикого типа. Изменение шапероноподобных свойств при точечных заменах, вероятно, может приводить к негативным последствиям, усиливая неспецифическое связывание со значительным количеством внутриклеточных белков, что может нарушать или изменять взаимодействие HspB6 как с физиологическими субстратами, так и с белками-партнерами.

Подытоживая этот раздел, можно заключить, что точечные мутации S10F и P20L, ассоциированные с развитием кардиомиопатии, значимо не влияют на взаимодействие HspB6 с белками-партнерами, однако приводят к существенному изменению физико-химических свойств HspB6. Эти мутации сопровождаются увеличением поверхностной гидрофобности белка, уменьшением его термической стабильности, повышенной склонностью к самоассоциации и усилением шапероноподобных свойств. Все вышеуказанные факторы могут приводить к уменьшению кардиопротекторной активности HspB6 и, как следствие, к развитию кардиомиопатии.

Исследовав роль N-концевого домена малых белков теплового шока HspB1, HspB5 и HspB6 в процессах гомо- и гетероолигомеризации, мы перешли к изучению свойств двух других малых белков теплового шока, HspB7 и HspB8.

6. Особенности строения и свойства N-концевого домена HspB7 и HspB8

Малые белки теплового шока HspB7 и HspB8 являются одними из наименее изученных представителей семейства sHsp человека. В первой части работы было показано, что особенности первичной структуры α -кристаллиновых доменов HspB7 и HspB8 не позволяют им сформировать устойчивые димеры в растворе (рис. 14 Г, Д). Кроме того, α -кристаллиновые домены HspB7 и HspB8 не взаимодействуют с полноразмерными HspB1, HspB5 и HspB6 (Приложение 4), а также с дестабилизированной псевдофосфорилированной 3D формой HspB1 (рис. 19). Изучение ACD является важным этапом при построении базовой модели малых белков теплового шока, тем не менее для понимания функций sHsp необходимо изучать и их N- и C-концевые домены, чья структура может эволюционировать независимо от структуры ACD [24]. Важно отметить, что HspB7 и HspB8 содержат необычные последовательности в первичной структуре N-концевых доменов (полисериновая последовательность у HspB7 и PPPFP мотив у HspB8) (рис. 3). Кроме того, в C-концевых доменах обоих белков отсутствует консервативная IxI последовательность, играющая важную роль в построении крупных олигомеров. Все это позволяет предположить, что олигомерная структура и участки взаимодействия HspB7 и HspB8 с другими малыми белками теплового шока определяются особенностями структуры их N- и C-концевых доменов. Поэтому нам показалось целесообразным более подробно исследовать особенности строения и свойства N-концевых доменов этих малоизученных белков.

HspB7 (cvHsp) является тканеспецифичным белком, экспрессия которого особенно высока в инсулин-зависимых тканях (сердце, скелетных мышцах, адипоцитах) [173, 22]. Олигомерная структура и физико-химические свойства этого белка до последнего времени были практически

не изучены. В отличие от других sHsp, для HspB7 описано несколько изоформ, отличающихся по первичной структуре [124, 173]. N-концевой домен HspB7 содержит нехарактерную для sHsp полисериновую последовательность, а также, в отличие от других представителей семейства, не содержит остатков Trp [124]. Структура N-концевого домена вероятнее всего не содержит вторичных структур и является разупорядоченной [53]. Низкое содержание ароматических остатков аминокислот в структуре HspB7 обуславливает крайне низкий удельный коэффициент поглощения при 280 нм ($A_{280}^{0.1\%} = 0.08$), что вносит дополнительные трудности при работе с данным белком. Выделение рекомбинантного HspB7 также не лишено трудностей. При экспрессии в бактериях рекомбинантный HspB7 имеет тенденцию накапливаться в тельцах включения, а в процессе выделения значительная часть белка преципитирует в виде агрегатов. Для того, чтобы получить рекомбинантный HspB7 в препаративных количествах в ходе нашей работы мы разработали собственную методику экспрессии и выделения рекомбинантного HspB7, которая позволила разделить изолированный белок на препарат, содержащий только малые олигомеры (HspB7-S), и препарат, содержащий как крупные, так и малые олигомеры (HspB7-L) (рис. 13). Оба препарата были проанализированы методом аналитической гель-фильтрации. Препарат HspB7-L элюировался в виде двух пиков с кажущимися молекулярными массами около 36 и более 600 кДа (рис. 30 А). При этом нанесение уменьшающихся количеств белка на колонку не влияло на распределение белка в пиках элюции, что свидетельствует либо о крайне медленном равновесии между двумя формами HspB7, либо о его полном отсутствии (рис. 30 А). HspB7-S элюировался в виде симметричного пика с кажущейся молекулярной массой в 36 кДа и изменение количества белка, наносимого на колонку, также не влияло на положение пика и его молекулярную массу (рис. 30 Б). Кажущаяся масса в 36 кДа (при расчетной массе мономера в 18.6 кДа) может указывать на то, что полноразмерный HspB7 в отличие от изолированного ACD все-таки может формировать олигомерную структуру и, вероятнее всего, представлен в виде димеров.

В структуре HspB7 присутствует единственный остаток цистеина в 126 положении, расположенный на краю β 7-складки, что делает возможным формирование дисульфидного мостика между двумя мономерами. Более того, этот цистеин обладает ярко выраженными нуклеофильными свойствами, что позволяет ему легко вступать в реакции алкилирования под действием разных химических агентов [174]. Действительно, при мягком окислении препарата HspB7-S диализом против буфера, не содержащего восстановителей, образуется небольшое количество димеров, сшитых дисульфидным мостиком, а также происходит накопление крупных частиц и уменьшение количества малых олигомерных форм (рис. 30 В, Г). Важно отметить, что в таком эксперименте в пике малых олигомеров также детектируется присутствие сшитых

димеров (рис. 30 Г). В свою очередь, восстановление HspB7-L избытком ДТТ с последующей модификацией SH-группы йодацетамидом, предотвращает образование высокомолекулярных комплексов (рис. 30 В, Г). Полученная совокупность данных позволяет высказать несколько предположений. Во-первых, малые олигомерные формы HspB7-S вероятнее всего являются димерами. Во-вторых, формирование димера, сшитого дисульфидным мостиком, не является определяющим фактором перехода белка в форму крупных олигомеров. В-третьих, крупные частицы HspB7 скорее всего являются агрегатами белка, а не его олигомерными формами, так как образование крупных частиц HspB7, вероятнее всего, связано с окислением реакционноспособного Cys126 кислородом воздуха, что может вызывать изменение структуры HspB7, провоцируя его агрегацию.

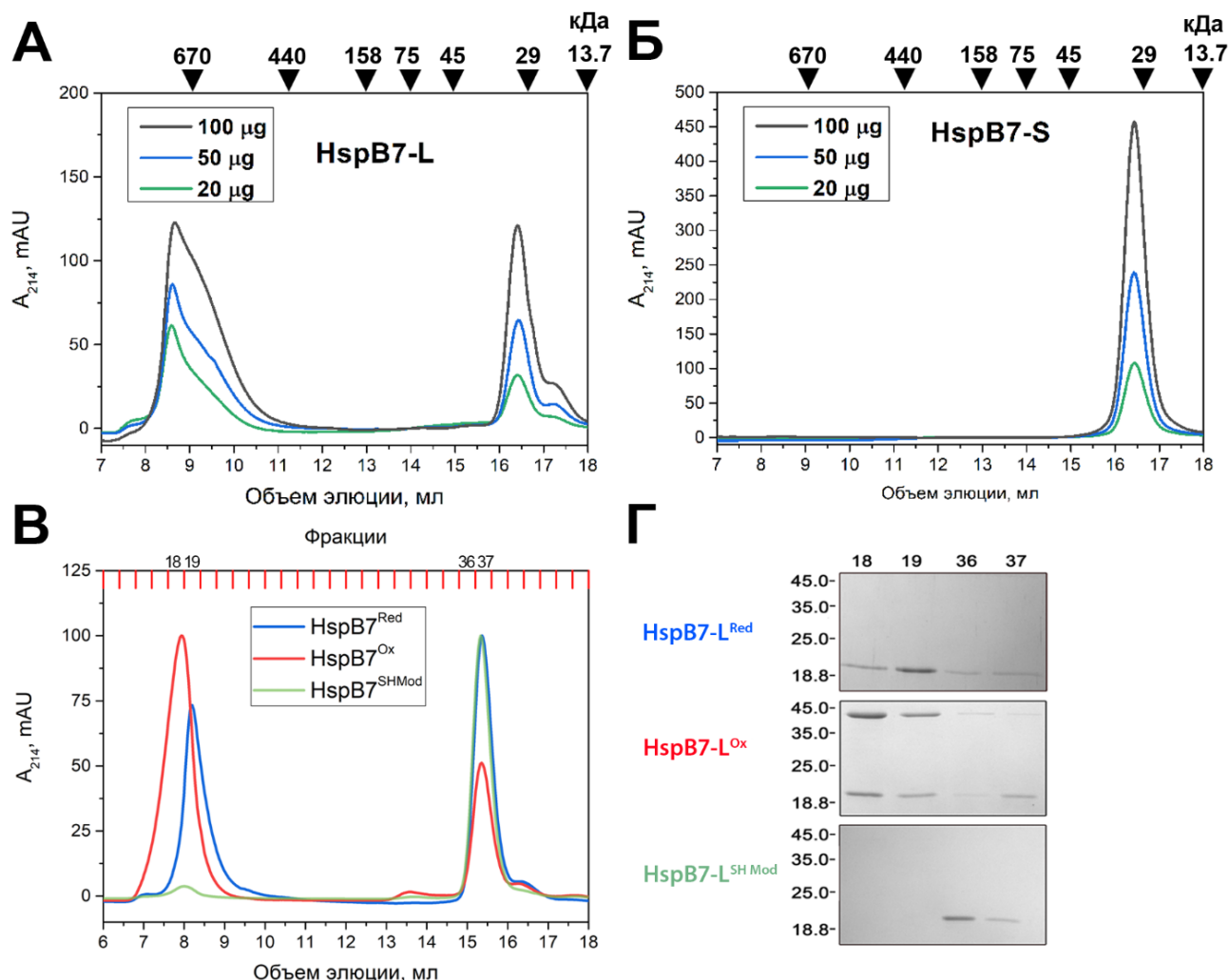


Рис. 30. Анализ олигомерного состояния препаратов, очищенного HspB7. Гель-фильтрация препаратов HspB7-L (**А**) и HspB7-S (**Б**) при разных количествах белка (20, 50, 100 мкг), нанесенного на колонку. Молекулярные массы белков стандартов указаны стрелками над панелями. **В.** Гель-фильтрация восстановленного (синяя линия, Red), окисленного (красная линия, Ox) и модифицированного йодацетамидом (зеленая линия, SH Mod) препарата HspB7-L. **Г.** Анализ белкового состава фракций 18, 19, 36 и 37, содержащих соответственно белки с высокой и низкой кажущейся молекулярной массой.

Для определения участков N-концевого домена, принимающих участие в формировании четвертичной структуры и/или процессах агрегации HspB7 мы использовали делеционные мутантные формы этого белка. Для этого были удалены либо первые 13 аминокислот ($\Delta 13$ мутант), либо было проведено удаление характерной полисериновой последовательности, расположенной между 17 и 29 остатками в первичной структуре (ΔSer мутант) HspB7. При экспрессии этих мутантных форм лишь небольшая доля белка переходила в тельца включения, а в ходе выделения оба делеционных мутанта практически не преципитировали в отличие от HspB7 дикого типа. Кроме того, при проведении гидрофобной хроматографии препарат HspB7 ΔSer практически не сорбировался на колонке и оставался целиком во фракции «проскока» (Приложение 7), что указывало на изменение гидрофобных характеристик поверхности ΔSer мутанта.

Влияние исследуемых делеций на олигомерную структуру оценивали методом аналитической гель-фильтрации. Как препарат HspB7 $\Delta 13$, так и препарат HspB7 ΔSer элюировались с колонки в виде одного симметричного пика с кажущейся молекулярной массой равной 36 кДа (рис. 31 В, Г), что соответствует положению и молекулярной массе пика малых олигомеров в препарате HspB7-S (рис. 31 А). Отсутствие крупных частиц в препаратах двух делеционных мутантов свидетельствует в пользу того, что удаление данных участков предотвращает агрегацию или формирование крупных олигомеров HspB7, но не влияет на четвертичную структуру малых олигомеров.

Как было показано во второй части работы, α -кристаллиновый домен HspB7 не формирует устойчивой димерной структуры. Помимо этого, в структуре полноразмерного HspB7 в С-концевом участке нет IxI-мотива, играющего важную роль в процессах олигомеризации. Тем не менее, полноразмерный HspB7 обладает способностью формировать четвертичную структуру. Это может указывать на то, что основную роль в построении малых олигомеров HspB7-S играют последовательности N- или С-концевых доменов. Опыты с окислением полноразмерного белка показывают, что мономеры HspB7 могут формировать дисульфидный мостик, а значит интерфейс димеризации принципиально может быть сформирован. Вероятно, слабые взаимодействия между двумя α -кристаллиновыми доменами могут далее стабилизироваться за счет дополнительных контактов N- или С-концевых последовательностей. Такие контакты и стабилизирующее взаимодействие участков N-концевого домена с поверхностью α -кристаллиновых доменов димера HspB1 было недавно показано в лаборатории Клевит (R.E. Klevit) методом ЯМР [68].

Способность HspB7 формировать агрегаты и ключевая роль N-концевого домена в этом процессе находятся в определенном согласии с серией работ проведенных под руководством

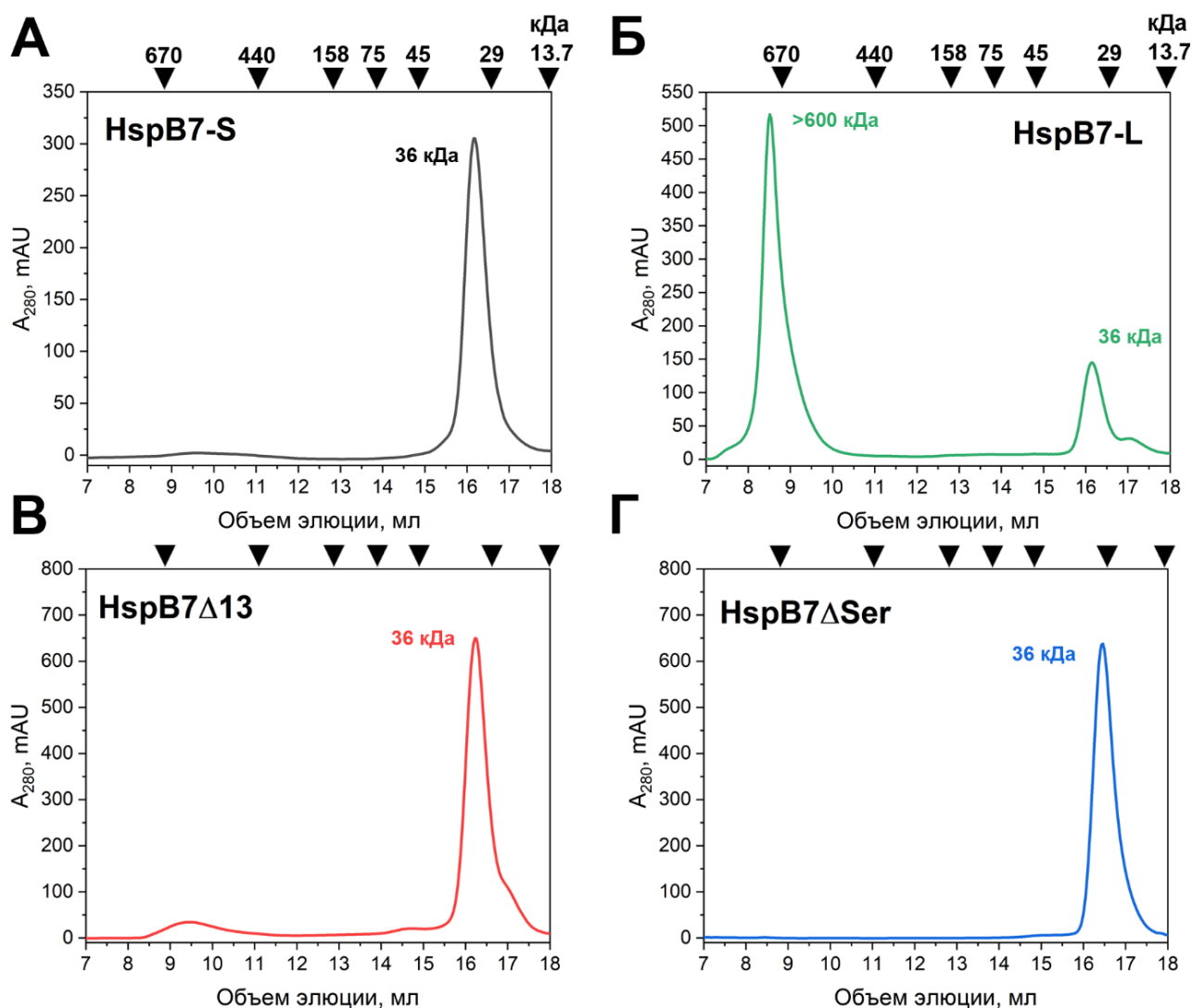


Рис. 31. Олигомерная структура препаратов HspB7-S (А), HspB7-L (Б), HspB7 Δ 13 (В) и HspB7 Δ Ser (Г), исследованная методом аналитической гель-фильтрации. Молекулярные массы белков стандартов указаны над стрелками над каждой панелью. Рассчитанные кажущиеся молекулярные массы указаны рядом с каждым из пиков элюции.

профессора Кампинги (Н. Kampinga). В этих работах, нацеленных на изучение функций HspB7 в клетке было показано, что экспрессия HspB7 в клетках НЕК293 приводит к накоплению белка в безмембранных ядерных органеллах SC35, причем удаление всего N-концевого домена лишает HspB7 ядерной локализации [22]. Кроме того, в клетке HspB7 проявляет наибольшую шапероноподобную активность в отношении амилоидогенных фрагментов Хантингина или фрагмента Ataxin-3, причем наличие N-концевого домена в структуре HspB7 является необходимым условием для предотвращения амилоидогенной агрегации [148, 175]. Учитывая, что среди всех малых белков теплового шока HspB7 практически не обладает шапероноподобной активностью в отношении субстратов, агрегирующих по аморфному пути [21], можно предположить, что в N-концевом домене HspB7 содержатся особые «липкие» участки, участвующие во взаимодействии с необычными для других sHsp клеточными субстратами (амилоидогенными образованиями). Наличие белков-партнеров, по всей видимости,

стабилизирует структуру HspB7 на уровне малых олигомеров [175], однако в очищенном препарате HspB7 в отсутствие белков-партнеров N-концевые домены, вероятно, взаимодействуют друг с другом, что приводит к агрегации молекул белка и формированию крупных частиц, причем окисление Cys126 усиливает этот процесс (рис 30 В, Г). При этом делеции (Δ I3 и Δ Ser) в начале N-концевого домена в обоих случаях предотвращают формирование крупных частиц (рис. 31 В, Г). Таким образом, начальные участки N-концевого домена могут дестабилизировать структуру и провоцировать агрегацию HspB7.

Полученные результаты подчеркивают важность всего N-концевого домена в определении свойств HspB7 и необходимость дальнейших исследований N-концевого домена этого белка.

Еще одним «неканоническим» представителем семейства sHsp является HspB8 (Hsp22). Он экспрессируется во многих тканях и наиболее представлен в сердце и скелетной мускулатуре, где совместно с другими sHsp (HspB1, HspB5, HspB6, HspB7) поддерживает протеостаз мышц [22, 176, 3]. HspB8 также активно экспрессируется в нервной ткани и нейроглии, выполняя нейропротекторную функцию [139]. По сравнению с другими малыми белками теплового шока HspB8 проявляет крайне низкую шапероноподобную активность [21] и аналогично HspB7 обладает способностью предотвращать амилоидную агрегацию [177, 178]. Предполагается, что HspB8, вероятнее всего, функционирует по специальному механизму, где в составе тройного комплекса Hsp70-BAG3-HspB8, участвует в процессе шаперон-зависимой селективной аутофагии (CASA) [129, 139]. Олигомерное состояние HspB8 до сих пор остается предметом дискуссий. Так, высказываются предположения, что в клетке HspB8 может формировать крупные олигомеры [120, 121], а в растворе HspB8 может быть представлен в виде равновесной смеси мономера и димера [177, 153, 179]. С-концевой домен HspB8 не содержит IxI-мотива, а в N-концевом домене HspB8 располагаются как консервативный sRLFDQxFG мотив, так и необычная для sHsp последовательность 86 TRPPFP 92 . Эти аминокислотные последовательности могут принимать участие в формировании четвертичной структуры HspB8, что делало целесообразным более подробное исследование влияния N-концевого домена на олигомерную структуру HspB8.

Для уточнения олигомерного состояния HspB8 в растворе в нашей работе мы сравнили положение пика элюции препарата очищенного HspB8 с другими sHsp, формирующими малые олигомеры. Оказалось, что максимум пика элюции HspB8 расположен правее (рис. 32 А), чем максимум элюции HspB6 (в растворе формирует устойчивые димеры) и максимум элюции HspB7 (представлен малыми олигомерами (вероятно, димерами)). Учитывая, что среди трех исследованных малых белков теплового шока мономер HspB8 обладает наибольшей молекулярной массой, можно предположить, что HspB8 обладает отличным олигомерным

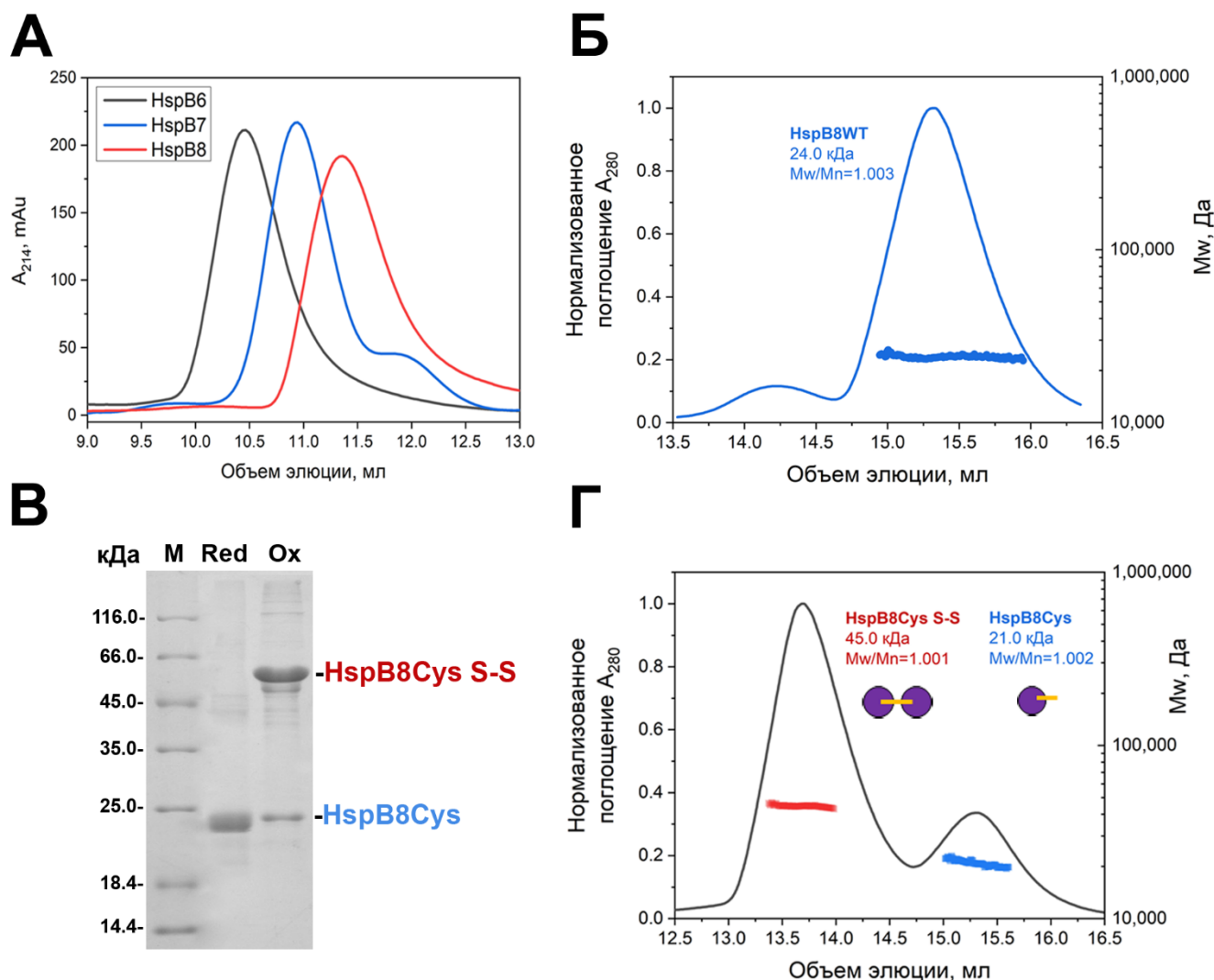


Рис. 32. Олигомерное состояние HspB8. **А.** Аналитическая гель-фильтрация препаратов HspB6, HspB7 и HspB8 на колонке Superdex75. **Б.** Определение абсолютной молекулярной массы HspB8 дикого типа методом аналитической гель-фильтрации, сопряженной с детектором MALS. На колонку Superdex 200 Increase 10/300 наносили 200 мкг белка. Полученная молекулярная масса и индекс полидисперсности указаны рядом с пиком элюции. **В.** Химическое сшивание препарата Cys-мутанта HspB8 (HspB8Cys). Red – дорожка соответствующая восстановленному препарату до окисления. Ox – дорожка, соответствующая препарату белка после окисления. Полоса, соответствующая S-S сшитому димеру обозначена, как (HspB8Cys S-S). **Г.** Определение абсолютной молекулярной массы препарата окисленного HspB8Cys методом аналитической гель-фильтрации, сопряженной с детектором MALS. На колонку Superdex 200 Increase 10/300 наносили 200 мкг белка и проводили хроматографию в отсутствие ДТТ. Полученная молекулярная масса и индекс полидисперсности указаны рядом с пиками элюции. Димерное состояние HspB8Cys S-S схематически иллюстрировано двумя фиолетовыми кругами (мономерами), соединенными желтой линией (S-S мостик).

состоянием. Действительно, при определении молекулярной массы методом SEC-MALS нам удалось показать, что усредненная молекулярная масса полноразмерного HspB8 в пике элюции составляет 24.0 кДа (при расчетной массе мономера в 21.5 кДа) (рис. 32 Б), что указывает на мономерное состояние этого белка в растворе. Полученный результат хорошо согласуется с данными об олигомерном состоянии α -кристаллинового домена HspB8, который также не формирует димеров (рис. 14 Е). N-концевой домен HspB8 содержит консервативный sRLFDQxFG мотив, который принимает участие в олигомеризации sHsp. По этой причине мы

проверяли может ли формирование димеров HspB8 провоцировать образование более крупных олигомеров. Для этого мы использовали Cys-мутант HspB8, полученный и охарактеризованный ранее в нашей лаборатории [153]. При окислении такой мутантной формы около 90% препарата формирует S-S сшитый димер (рис. 32 В). При анализе олигомерного состояния окисленного Cys-мутанта HspB8 методом SEC-MALS было обнаружено, что препарат такого белка состоит только из «сшитых» димеров с молекулярной массой 45.0 кДа и мономеров с молекулярной массой 21.0 кДа (рис. 33 Г). Таким образом α -кристаллиновый домен HspB8 обладает способностью формировать неустойчивый интерфейс димеризации, который в растворе может быть зафиксирован только с помощью дисульфидного мостика [153] или с помощью химической сшивки [179]. При этом формирование димера HspB8 не приводит к дальнейшей олигомеризации белка, что вероятно связано с тем, что в его С-концевом домене отсутствует IxI-мотив, участвующий в олигомеризации, а sRLFDQxFG мотив в N-концевом домене представлен несколько изменённой последовательностью SRLDDGFG. В совокупности полученные результаты указывают на то, что необычное строение HspB8 в первую очередь связано с особой структурой его α -кристаллинового домена, не способного формировать устойчивые димеры, а N-концевая последовательность, в отличие от HspB7, не принимает участие в олигомеризации HspB8.

Экспериментальные данные указывают на то, что основным партнером HspB8 в клетке является адаптерный белок BAG3, который также взаимодействует и с Hsp70 [129, 140, 138]. Такой тройной комплекс HspB8-BAG3-Hsp70 участвует в разрушении крупных белковых структур по механизму шаперон-опосредованной селективной аутофагии (CASA) [139]. Наличие двух IxI мотивов в составе BAG3 позволяет предположить, что наиболее вероятная стехиометрия комплекса BAG3 с HspB8 составляет 1 к 2 [128, 140], кроме того добавление HspB8 приводит к структурированию внутренне разупорядоченного BAG3 [142]. Тем не менее на данный момент остается невыясненным, каким образом происходит процесс упорядочивания комплекса: структурируются ли участки обоих взаимодействующих белков или только одного из белков в комплексе. Еще одним белком, принимающим участие в аутофагии, является HspB7. Данные коиммунопреципитации косвенно указывают на то, что HspB7 не взаимодействует с BAG3 [148, 147, 146, 143] и участвует в аутофагии по BAG3-независимому пути. Как было показано ранее HspB7, как и HspB8, содержит α -кристаллиновый домен, чье строение отличается от «канонических» α -кристаллиновых доменов HspB1, HspB5 и HspB6. Необычная N-концевая последовательность HspB7 может блокировать участки взаимодействия на поверхности α -кристаллинового домена с IxI-мотивами BAG3. Поэтому в нашей работе мы подробнее исследовали взаимодействие между BAG3 и полноразмерными HspB7 и HspB8, а также BAG3 с α -кристаллиновыми доменами HspB7 и HspB8.

Взаимодействие между парами белков исследовали методом гель-фильтрации. В согласии с ранее опубликованными данными [142] при смешении в молярном соотношении 2:1 полноразмерный HspB8 практически полностью переходит в комплекс с BAG3 (рис. 33 А). При этом формируется комплекс с меньшей кажущейся молекулярной массой по сравнению с BAG3, что свидетельствует об общем упорядочивании структуры комплекса (рис. 33 А). В свою очередь полноразмерный HspB7 не взаимодействует с BAG3 ни при смешении в молярном соотношении 2:1 (рис. 33 Б), ни при других соотношениях HspB7 к BAG3 (данные не приведены). При совместной инкубации BAG3 с α -кристаллиновым доменом HspB8 (B8ACD) в соотношении B8ACD/BAG3 равном 2:1 также, как и в случае с полноразмерным белком происходит полное включение B8ACD в комплекс с BAG3 (рис. 33 В). Положение пика комплекса BAG3/B8ACD также смещено в сторону меньших молекулярных масс, что указывает на общее

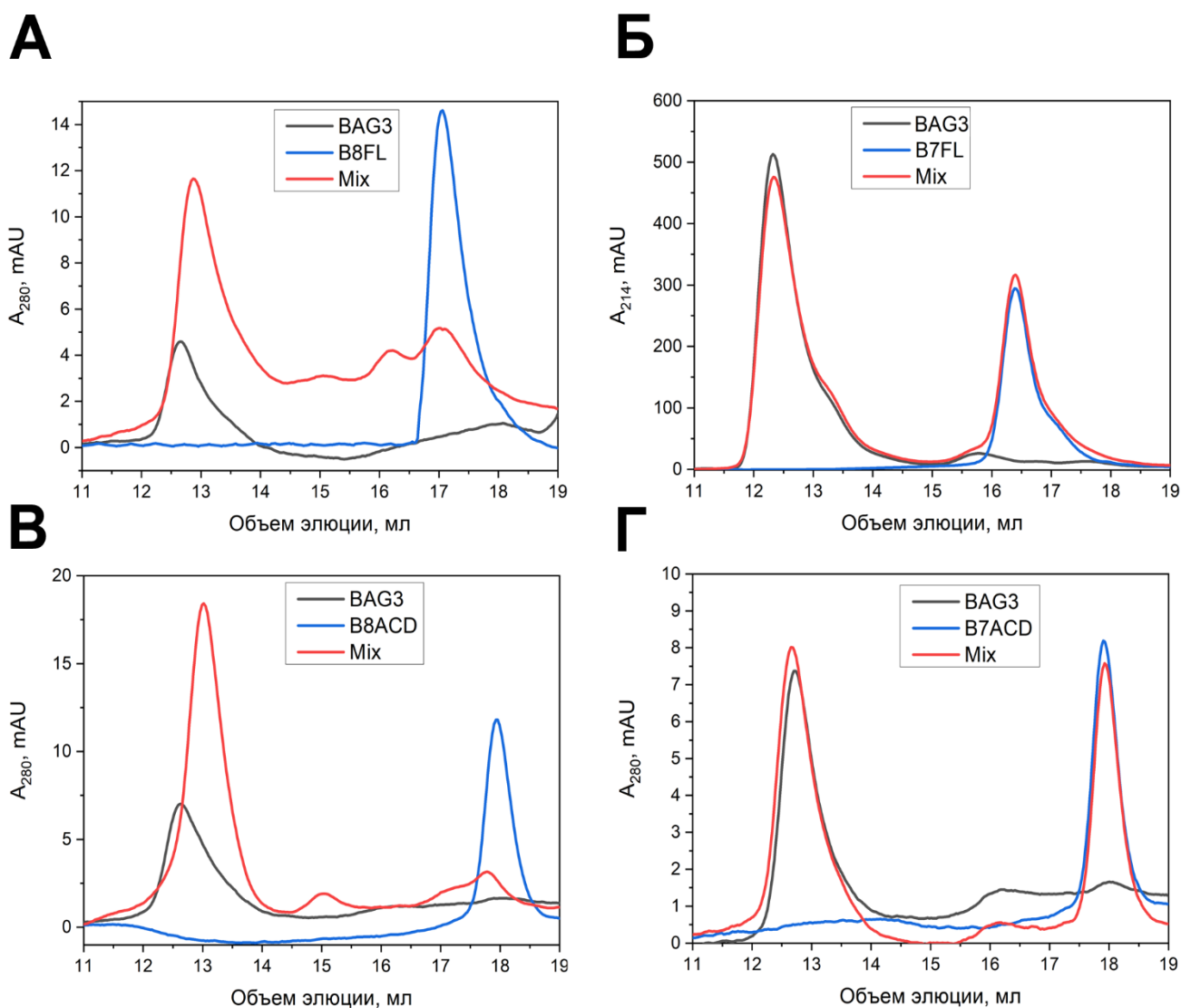


Рис. 33. Исследование процессов комплексообразования между BAG3 и полноразмерными HspB8 (B8FL) (А) и HspB7 (B7FL) (Б), а также BAG3 и α -кристаллиновыми доменами HspB8 (B8ACD) (В) и HspB7 (B7ACD) (Г). На панелях изображены профили элюции изолированного BAG3 (черная линия), изолированных sHsp и ACD (синяя линия), а также их смесей (Mix) (красная линия), преинкубированных при 42°C в соотношении sHsp(ACD)/BAG3 равном 2:1.

структурирование такого комплекса. При смешении BAG3 с α -кристаллиновым доменом HspB7 (B7ACD) методом гель-фильтрации какого-либо взаимодействия между белками детектировать не удастся (рис. 33 Г).

Таким образом, BAG3 взаимодействует как с полноразмерным HspB8, так и с его α -кристаллиновым доменом, причем в обоих случаях происходит структурирование комплекса белков (рис. 33 А, В). В этих же условиях оказалось, что BAG3 не взаимодействует ни с полноразмерным HspB7, ни с его ACD (рис. 33 Б, Г). Отсутствие взаимодействия BAG3 с α -кристаллиновым доменом HspB7 является достаточно неожиданным результатом. Так в литературе показано, что посредством IxI мотивов BAG3 взаимодействует с α -кристаллиновым доменом HspB1 [140], а также с полноразмерными HspB2 [143], HspB5 [46, 144] и HspB6 [46, 142, 140]. Кроме того, при анализе аминокислотного состава β 4/ β 8 канавок малых белков теплового шока, участвующих в связывании IxI мотивов BAG3, и β 4/ β 8 канавки HspB7 не удастся обнаружить существенные различия в первичных структурах β 4 и β 8 складок. Так, например, в структуре HspB8 β 4/ β 8 канавка состоит из аминокислот β 4 – LVT; β 8 – VAL, а в структуре HspB7 - β 4 – IVT; β 8 – VSL (рис. 3). При этом замена L на I в β 4-складке и A на S в β 8 складке также встречается в структуре HspB6, который способен взаимодействовать с BAG3. В совокупности полученный результат указывает на то, что α -кристаллиновый домен HspB7, скорее всего, обладает необычной пространственной структурой, что не только препятствует его взаимодействию с другими sHsp, но и нарушает его взаимодействие с BAG3. При этом HspB7 участвует в процессах аутофагии и необходим для поддержания структуры саркомера [180], а также восстановления сердечной мышцы после нагрузок [150, 151], что делает актуальным дальнейший поиск и выяснение механизмов функционирования HspB7 в клетке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Малые белки теплового шока (sHsp) – разнообразная группа АТФ-независимых белков-шаперонов, играющих важную роль в поддержании клеточного протеостаза. В функционировании sHsp особую роль играет переменный N-концевой домен. Он участвует в процессах олигомеризации sHsp, взаимодействии с белками-партнерами и белками-субстратами, а также необходим для проявления шапероноподобной активности малыми белками теплового шока. В геноме человека закодировано 10 генов sHsp, причем каждый из представителей семейства этих белков обладает уникальным N-концевым доменом. В структуре N-концевых последовательностей некоторых sHsp человека обнаруживается небольшой полуконсервативный набор аминокислот, который принято обозначать, как sRLFDQxFG мотив. Малые белки теплового шока часто ко-экспрессируются и могут формировать гетероолигомерные комплексы, которые образуются также при участии N-концевого домена. Молекулярные механизмы участия N-концевого домена, а также роль sRLFDQxFG мотива в процессах гомо- и гетероолигомеризации до последнего времени оставались не выясненными и мало изученными. Многие мутации, ассоциированные с развитием наследственных заболеваний, также часто обнаруживаются именно в N-концевом домене. Все это подчеркивает важность N-концевого домена в структуре sHsp и делает целесообразным его подробное исследование.

Мы проанализировали влияние N-концевого домена на физико-химические свойства и процессы гомо- и гетероолигомеризации пяти малых белков теплового шока (HspB1, HspB5, HspB6, HspB7 и HspB8). Установлено, что по особенностям строения α -кристаллиновых доменов и их N-концевых доменов малые белки теплового шока можно условно разделить на две группы (рис. 34). К первой группе относятся HspB1, HspB5 и HspB6, чьи α -кристаллиновые домены формируют устойчивые димеры, а полноразмерные белки способны формировать гетерокомплексы друг с другом. В N-концевом домене этих белков содержится консервативный sRLFDQxFG мотив, регулирующий процесс гомоолигомеризации крупных комплексов, а также включение субъединиц в состав гетероолигомера. Введение отрицательного заряда в структуру N-концевого домена (путем фосфорилирования или путем фосфоимитирующих мутаций), замена остатка Arg на Ala в консервативном мотиве или делеция пентапептида SRLFD дестабилизирует структуру крупных олигомеров HspB1 и HspB5, что облегчает гетероолигомеризацию этих белков с HspB6. Аналогичные изменения в структуре HspB6 напротив уменьшают вероятность его встраивания в гетероолигомерные комплексы, что может быть связано с тем, что этот белок не содержит в своей структуре «липкого» IxI-мотива в C-концевом домене и поэтому его гетероолигомеризация целиком определяется целостностью и интактностью его N-концевого

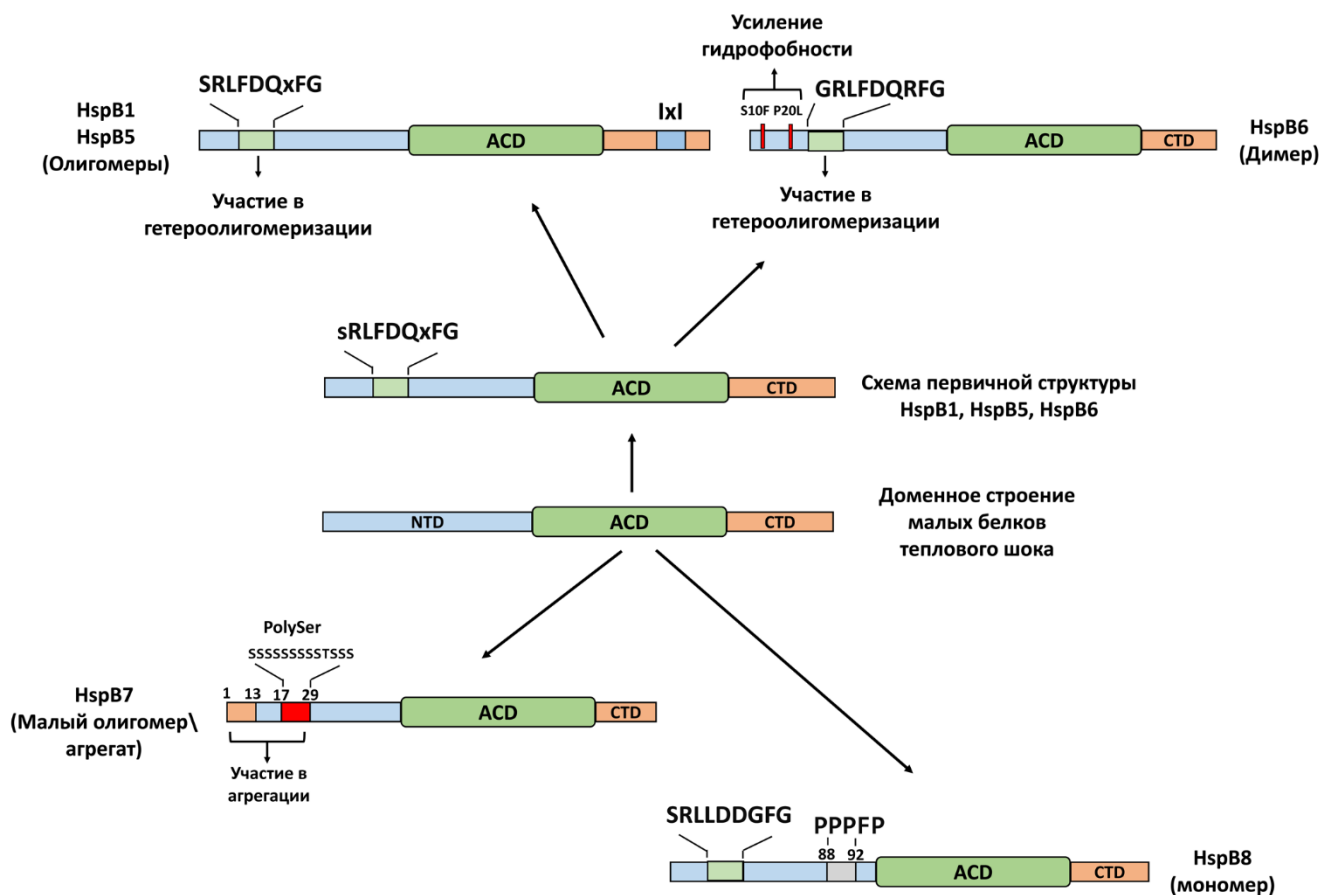


Рис. 34. Схема строения пяти малых белков теплового шока и особенности строения их N-концевых доменов. Участки N-концевых доменов, роль которых была проанализирована в данной работе и обсуждается в литературе, схематично показаны в виде цветных прямоугольников. Олигомерное строение малых белков теплового шока указано в скобках. ACD – α -кристаллиновый домен, NTD – N-концевой домен, CTD – C-концевой домен.

домена. Точечные замены S10F и P20L в структуре N-концевого домена HspB6, расположенные в непосредственной близости от консервативного мотива, не изменяют характер взаимодействия HspB6 с белками-партнерами, однако приводят к изменению физико-химических свойств белка. Указанные замены, ассоциированные с развитием кардиомиопатий, приводят к увеличению гидрофобности, понижению термостабильности, изменению скорости фосфорилирования и изменению шапероноподобных свойств этого белка. Все это в совокупности может приводить к нарушению кардиопротекторных свойств HspB6 и служить одной из причин развития кардиомиопатий.

Ко второй группе можно отнести малые белки теплового шока HspB7 и HspB8. Их α -кристаллиновые домены не формируют устойчивых димеров и не взаимодействуют с другими sHsp. В N-концевых доменах HspB7 и HspB8 содержатся уникальные аминокислотные последовательности, а sRFLDQxFG мотив либо отсутствует (HspB7), либо представлен в изменённой форме (HspB8) (рис. 34). Особенности строения α -кристаллинового и N-концевого доменов, а также отсутствие консервативного IxI-мотива в C-концевом домене этих белков

приводят к тому, что оба этих белка представлены либо в виде малых олигомеров (HspB7), либо в виде мономеров (HspB8). Как α -кристаллиновый домен HspB7, так и его полноразмерная форма не взаимодействуют с белком BAG3, что указывает на особую роль HspB7 в процессе аутофагии. Первые 29 аминокислот N-концевого домена HspB7 играют важную роль в регуляции олигомерного состояния/агрегации этого белка, а также во взаимодействии с потенциальными белками-партнерами и в формировании безмембранных внутриядерных структур [22]. α -кристаллиновый домен и полноразмерная форма HspB8 эффективно взаимодействуют с адаптерным белком BAG3, приводя к его компактизации. Несмотря на особенности первичной структуры N-концевого домена HspB8, олигомерное строение этого белка определяется в первую очередь особенностями структуры его α -кристаллинового домена. Эти отличительные черты строения, вероятно, обеспечивают прочное взаимодействие HspB8 с Bag3 и участие этого малого белка теплового шока в процессах шаперон-зависимой селективной аутофагии [129].

Таким образом, точка зрения о том, что эволюция α -кристаллиновых доменов и их N- и C-концевых доменов протекает независимо [24], 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 C-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 ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Janowska M.K., Baughman H.E.R., Woods C.N., Klevit R.E.* Mechanisms of Small Heat Shock Proteins // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* — 2019. — Vol. 1, №3 — P. 1–20.
2. *Hipp M.S., Kasturi P., Hartl F.U.* The proteostasis network and its decline in ageing // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2019. — Vol. 20, №7 — P. 421–435.
3. *Tedesco B., Cristofani R., Ferrari V., Cozzi M., Rusmini P., Casarotto E., Chierichetti M., Mina F., Galbiati M., Piccolella M., Crippa V., Poletti A.* Insights on Human Small Heat Shock Proteins and Their Alterations in Diseases // *Front. Mol. Biosci.* — 2022. — Vol. 9, №2 — P. 1–27.
4. *Haslbeck M., Weinkauf S., Buchner J.* Small heat shock proteins: Simplicity meets complexity // *J. Biol. Chem.* — 2019. — Vol. 294, №6 — P. 2121–2132.
5. *Rebeaud M.E., Mallik S., Goloubinoff P., Tawfik D.S.* On the evolution of chaperones and cochaperones and the expansion of proteomes across the Tree of Life // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2021. — Vol. 118, №21 — P. 1–10.
6. *Mattoo R.U.H., Goloubinoff P.* Molecular chaperones are nanomachines that catalytically unfold misfolded and alternatively folded proteins // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2014. — Vol. 71, №17 — P. 3311–3325.
7. *Maaroufi H., Tanguay R.M.* Analysis and phylogeny of small heat shock proteins from marine viruses and their cyanobacteria host // *PLoS One* — 2013. — Vol. 8, №11 — P. 1–9.
8. *Bourrelle-Langlois M., Morrow G., Finet S., Tanguay R.M.* In vitro structural and functional characterization of the small heat shock proteins (sHSP) of the cyanophage S-ShM2 and its host, synechococcus sp. WH7803 // *PLoS One* — 2016. — Vol. 11, №9 — P. 1–21.
9. *Mayer M.P.* Gymnastics of molecular chaperones // *Mol. Cell* — 2010. — Vol. 39, №3 — P. 321–331.
10. *Vos M.J., Hageman J., Carra S., Kampinga H.H.* Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families // *Biochemistry* — 2008. — Vol. 47, №27 — P. 7001–7011.
11. *Hartl F.U., Bracher A., Hayer-Hartl M.* Molecular chaperones in protein folding and proteostasis // *Nature* — 2011. — Vol. 475, №7356 — P. 324–332.
12. *Alberti S., Mateju D., Mediani L., Carra S.* Granulostasis: Protein quality control of RNP granules // *Front. Mol. Neurosci.* — 2017. — Vol. 10, №84 — P. 1–14.
13. *Guenther E.L., Cao Q., Trinh H., Lu J., Sawaya M.R., Cascio D., Boyer D.R., Rodriguez J.A., Hughes M.P., Eisenberg D.S.* Atomic structures of TDP-43 LCD segments and insights into reversible or pathogenic aggregation // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2018. — Vol. 25, №6 — P. 463–471.
14. *Murray D.T., Kato M., Lin Y., Thurber K.R., Hung I., McKnight S.L., Tycko R.* Structure of FUS Protein Fibrils and Its Relevance to Self-Assembly and Phase Separation of Low-Complexity Domains // *Cell* — 2017. — Vol. 171, №3 — P. 615–627.
15. *Behl C.* Breaking BAG: The Co-Chaperone BAG3 in Health and Disease // *Trends Pharmacol. Sci.* 2016. V. 37. № 8. P. 672–688.
16. *Schopf F.H., Biebl M.M., Buchner J.* The HSP90 chaperone machinery // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2017. — Vol. 18, №6 — P. 345–360.
17. *Finka A., Mattoo R.U.H., Goloubinoff P.* Experimental Milestones in the Discovery of Molecular Chaperones as Polypeptide Unfolding Enzymes // *Annu. Rev. Biochem.* — 2016. — Vol. 85, №1 — P. 715–742.
18. *Datskevich P.N., Nefedova V. V., Sudnitsyna M. V., Gusev N.B.* Mutations of small heat shock proteins and human congenital diseases. // *Biochemistry. (Mosc.)* — 2012. — Vol. 77, №13 — P. 1500–1514.
19. *Mymrikov E. V., Seit-Nebi A.S., Gusev N.B.* Large Potentials of Small Heat Shock Proteins // *Physiol. Rev.* — 2011. — Vol. 91, №4 — P. 1123–1159.
20. *Treweek T.M., Meehan S., Ecroyd H., Carver J.A.* Small heat-shock proteins: Important players in regulating

cellular proteostasis // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2015. — Vol. 72, №3 — P. 429–451.

21. *Mymrikov E. V., Daake M., Richter B., Haslbeck M., Buchner J.* The chaperone activity and substrate spectrum of human small heat shock proteins // *J. Biol. Chem.* — 2017. — Vol. 292, №2 — P. 672–684.

22. *Vos M.J., Kanon B., Kampinga H.H.* HSPB7 is a SC35 speckle resident small heat shock protein // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* — 2009. — Vol. 1793, №8 — P. 1343–1353.

23. *Jong W.W. De, Caspers G., Leunissen J.A.M.* Alpha Crystallin Genealogy // *Int. J. Biol. Macromol.* — 1998. — Vol. 22, — P. 151–162.

24. *Kriehuber T., Rattei T., Weinmaier T., Bepperling A., Haslbeck M., Buchner J.* Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins // *FASEB J.* — 2010. — Vol. 24, №10 — P. 3633–3642.

25. *Kim K.K., Kim R., Kim S.H.* Crystal structure of a small heat-shock protein. // *Nature* — 1998. — Vol. 394, №6693 — P. 595–599.

26. *Aquilina J.A., Benesch J.L.P., Bateman O.A., Slingsby C., Robinson C. V.* Polydispersity of a mammalian chaperone: Mass spectrometry reveals the population of oligomers in α B-crystallin // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2003. — Vol. 100, №19 — P. 10611–10616.

27. *Montfort R.L. van, Basha E., Friedrich K.L., Slingsby C., Vierling E.* Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. // *Nat. Struct. Biol.* — 2001. — Vol. 8, №12 — P. 1025–1030.

28. *Ehrnsperger M., Lilie H., Gaestel M., Buchner J.* The dynamics of Hsp25 quaternary structure. Structure and function of different oligomeric species // *J. Biol. Chem.* — 1999. — Vol. 274, №21 — P. 14867–14874.

29. *Delbecq S.P., Klevit R.E.* One size does not fit all: The oligomeric states of α B crystallin // *FEBS Lett.* — 2013. — Vol. 587, №8 — P. 1073–1080.

30. *Peschek J., Braun N., Franzmann T.M., Georgalis Y., Haslbeck M., Weinkauff S., Buchner J.* The eye lens chaperone α -crystallin forms defined globular assemblies // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2009. — Vol. 106, №32 — P. 13272–13277.

31. *Stamler R., Kappé G., Boelens W., Slingsby C.* Wrapping the alpha-crystallin domain fold in a chaperone assembly // *J. Mol. Biol.* — 2005. — Vol. 353, №1 — P. 68–79.

32. *Saji H., Iizuka R., Yoshida T., Abe T., Kidokoro S.I., Ishii N., Yohda M.* Role of the IXI/V motif in oligomer assembly and function of StHsp14.0, a small heat shock protein from the acidothermophilic archaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7 // *Proteins Struct. Funct. Genet.* — 2008. — Vol. 71, №2 — P. 771–782.

33. *Hilario E., Martin F.J.M., Bertolini M.C., Fan L.* Crystal structures of xanthomonas small heat shock protein provide a structural basis for an active molecular chaperone oligomer // *J. Mol. Biol.* — 2011. — Vol. 408, №1 — P. 74–86.

34. *Hanazono Y., Takeda K., Oka T., Abe T., Tomonari T., Akiyama N., Aikawa Y., Yohda M., Miki K.* Nonequivalence observed for the 16-meric structure of a small heat shock protein, SpHsp16.0, from *Schizosaccharomyces pombe* // *Structure* — 2013. — Vol. 21, №2 — P. 220–228.

35. *Bagnéris C., Bateman O.A., Naylor C.E., Cronin N., Boelens W.C., Keep N.H., Slingsby C.* Crystal Structures of α -Crystallin Domain Dimers of α B-Crystallin and Hsp20 // *J. Mol. Biol.* — 2009. — Vol. 392, №5 — P. 1242–1252.

36. *Laganowsky A., Benesch J.L.P., Landau M., Ding L., Sawaya M.R., Cascio D., Huang Q., Robinson C. V., Horwitz J., Eisenberg D.* Crystal structures of truncated alphaA and alphaB crystallins reveal structural mechanisms of polydispersity important for eye lens function. // *Protein Sci.* — 2010. — Vol. 19, №5 — P. 1031–1043.

37. *Baranova E. V., Beelen S., Gusev N.B., Strelkov S. V.* The taming of small heat-shock proteins: Crystallization of the α -crystallin domain from human Hsp27 // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* — 2009. — Vol. 65, №12 — P. 1277–1281.

38. *Baranova E. V., Weeks S.D., Beelen S., Bukach O. V., Gusev N.B., Strelkov S. V.* Three-dimensional structure of alpha-crystallin domain dimers of human small heat shock proteins HSPB1 and HSPB6 // *J. Mol. Biol.* — 2011. — Vol. 411, №1 — P. 110–122.

39. *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. — Vol. 25, №2 — P. 305–316.
40. *Clark A.R., Vree Egberts W., Kondrat F.D.L., Hilton G.R., Ray N.J., Cole A.R., Carver J.A., Benesch J.L.P., Keep N.H., Boelens W.C., Slingsby C.* Terminal Regions Confer Plasticity to the Tetrameric Assembly of Human HspB2 and HspB3 // J. Mol. Biol. — 2018. — Vol. 430, №18 — P. 3297–3310.
41. *Nappi L., Aguda A.H., Nakouzi N. Al, Lelj-Garolla B., Beraldi E., Lallous N., Thi M., Moore S., Fazli L., Battsoqt D., Stief S., Ban F., Nguyen N.T., Saxena N., Dueva E., Zhang F., Yamazaki T., Zoubeidi A., Cherkasov A., et al.* Ivermectin inhibits HSP27 and potentiates efficacy of oncogene targeting in tumor models // J. Clin. Invest. — 2020. — Vol. 130, №2 — P. 699–714.
42. *Hochberg G.K. a, Ecroyd H., Liu C., Cox D., Cascio D., Sawaya M.R., Collier M.P., Stroud J., Carver J. a, Baldwin A.J., Robinson C. V, Eisenberg D.S., Benesch J.L.P., Laganowsky A.* The structured core domain of α B-crystallin can prevent amyloid fibrillation and associated toxicity. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. — 2014. — Vol. 111, №16 — P. 1562–1570.
43. *Rajagopal P., Tse E., Borst A.J., Delbecq S.P., Shi L., Southworth D.R., Klevit R.E.* A conserved histidine modulates HSPB5 structure to trigger chaperone activity in response to stress related acidosis // Elife — 2015. — Vol. 4, — P. 1–21.
44. *Makley L.N., McMenimen K.A., DeVree B.T., Goldman J.W., McGlasson B.N., Rajagopal P., Duniak B.M., McQuade T.J., Thompson A.D., Sunahara R., Klevit R.E., Andley U.P., Gestwicki J.E.* Pharmacological chaperone for α -crystallin partially restores transparency in cataract models // Science (80-.). — 2015. — Vol. 350, №6261 — P. 674–677.
45. *Delbecq S.P., Jehle S., Klevit R.* Binding determinants of the small heat shock protein, α B-crystallin: Recognition of the 'IxI' motif // EMBO J. — 2012. — Vol. 31, №24 — P. 4587–4594.
46. *Fuchs M., Poirier D.J., Seguin S.J., Lambert H., Carra S., Charette S.J., Landry J.* Identification of the key structural motifs involved in HspB8/HspB6-Bag3 interaction // Biochem. J. — 2010. — Vol. 425, №1 — P. 245–255.
47. *Heirbaut M., Beelen S., Strelkov S. V., Weeks S.D.* Dissecting the Functional Role of the N-Terminal Domain of the Human Small Heat Shock Protein HSPB6 // PLoS One — 2014. — Vol. 9, №8 — P. 1–15.
48. *Plater M.L., Goode D., Crabbe M.J.C.* Effects of site-directed mutations on the chaperone-like activity of α B-crystallin // J. Biol. Chem. — 1996. — Vol. 271, №45 — P. 28558–28566.
49. *Chalova A.S., Sudnitsyna M. V., Strelkov S. V., Gusev N.B.* Characterization of human small heat shock protein HspB1 that carries C-terminal domain mutations associated with hereditary motor neuron diseases // Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics — 2014. — Vol. 1844, №12 — P. 2116–2126.
50. *Jovcevski B., Kelly M.A., Rote A.P., Berg T., Gastall H.Y., Benesch J.L.P., Aquilina J.A., Ecroyd H.* Phosphomimics destabilize Hsp27 oligomeric assemblies and enhance chaperone activity // Chem. Biol. — 2015. — Vol. 22, №2 — P. 186–195.
51. *Giese K.C., Vierling E.* Mutants in a small heat shock protein that affect the oligomeric state: Analysis and allele-specific suppression // J. Biol. Chem. — 2004. — Vol. 279, №31 — P. 32674–32683.
52. *Pasta S.Y., Raman B., Ramakrishna T., Rao C.M.* The IXI/V motif in the C-terminal extension of α -crystallins: alternative interactions and oligomeric assemblies // Mol. Vis. — 2004. — Vol. 10, — P. 655–662.
53. *Webster J.M., Darling A.L., Uversky V.N., Blair L.J.* Small heat shock proteins, big impact on protein aggregation in neurodegenerative disease // Front. Pharmacol. — 2019. — Vol. 10, №September — P. 1–18.
54. *Jehle S., Rossum B. van, Stout J.R., Noguchi S.M., Falber K., Rehbein K., Oschkinat H., Klevit R.E., Rajagopal P.* α B-Crystallin: A Hybrid Solid-State/Solution-State NMR Investigation Reveals Structural Aspects of the Heterogeneous Oligomer // J. Mol. Biol. — 2009. — Vol. 385, — P. 1481–1497.
55. *Ghosh J.G., Clark J.I.* Insights into the domains required for dimerization and assembly of human α B-crystallin. // Protein Sci. — 2005. — Vol. 14, — P. 684–695.
56. *Sudnitsyna M. V., Mymrikov E. V., S. Seit-Nebi A., B. Gusev N.* The Role of Intrinsically Disordered Regions in the Structure and Functioning of Small Heat Shock Proteins // Curr. Protein Pept. Sci. — 2012. — Vol. 13, №1

— P. 76–85.

57. Alderson T.R., Benesch J.L.P., Baldwin A.J. Proline isomerization in the C-terminal region of HSP27 // Cell Stress Chaperones — 2017. — Vol. 22, №4 — P. 639–651.

58. Baldwin A.J., Lioe H., Hilton G.R., Baker L.A., Rubinstein J.L., Kay L.E., Benesch J.L.P. The polydispersity of α B-crystallin is rationalized by an interconverting polyhedral architecture // Structure — 2011. — Vol. 19, №12 — P. 1855–1863.

59. Hochberg G.K.A., Shepherd D.A., Marklund E.G., Santhanagopalan I., Degiacomi M.T., Laganowsky A., Allison T.M., Basha E., Marty M.T., Galpin M.R., Struwe W.B., Baldwin A.J., Vierling E., Benesch J.L.P. Structural principles that enable oligomeric small heat-shock protein paralogs to evolve distinct functions // Science (80-.). — 2018. — Vol. 359, №6378 — P. 930–935.

60. Hilton G.R., Hochberg G.K.A., Laganowsky A., McGinnigle S.I., Baldwin A.J., Benesch J.L.P. C-terminal interactions mediate the quaternary dynamics of α B-crystallin // Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. — 2013. — Vol. 368, №1617 — P. 1–13.

61. Delbecq S.P., Rosenbaum J.C., Klevit R.E. A Mechanism of Subunit Recruitment in Human Small Heat Shock Protein Oligomers // Biochemistry — 2015. — Vol. 54, №28 — P. 4276–4284.

62. Haslbeck M., Weinkauff S., Buchner J. The Big Book on Small Heat Shock Proteins Heat Shock Proteins. / под ред. R.M. Tanguay, L.E. Hightower. Cham: Springer International Publishing, 2015. P. 155–178.

63. Horwitz J., Bova M., Huang Q.L., Ding L., Yaron O., Lowman S. Mutation of α B-crystallin: Effects on chaperone-like activity // Int. J. Biol. Macromol. — 1998. — Vol. 22, №3–4 — P. 263–269.

64. Shatov V.M., Weeks S.D., Strelkov S. V., Gusev N.B. The role of the arginine in the conserved N-terminal domain RLFDQxFG motif of human small heat shock proteins HspB1, HspB4, HspB5, HspB6, and HspB8 // Int. J. Mol. Sci. — 2018. — Vol. 19, №7 — P. 1–18.

65. Shatov V.M., Strelkov S. V., Gusev N.B. The heterooligomerization of human small heat shock proteins is controlled by conserved motif located in the n-terminal domain // Int. J. Mol. Sci. — 2020. — Vol. 21, №12 — P. 1–18.

66. Pasta S.Y., Raman B., Ramakrishna T., Rao C.M. Role of the conserved SRLFDQFFG region of α -crystallin, a small heat shock protein: Effect on oligomeric size, subunit exchange, and chaperone-like activity // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278, №51 — P. 51159–51166.

67. Takeda K., Hayashi T., Abe T., Hirano Y., Hanazono Y., Yohda M., Miki K. Dimer structure and conformational variability in the N-terminal region of an archaeal small heat shock protein, StHsp14.0 // J. Struct. Biol. — 2011. — Vol. 174, №1 — P. 92–99.

68. Clouser A.F., Baughman H.E.R., Basanta B., Guttman M., Nath A., Klevit R.E. Interplay of disordered and ordered regions of a human small heat shock protein yields an ensemble of ‘quasi-ordered’ states // Elife — 2019. — Vol. 8, — P. 1–31.

69. Braun N., Zacharias M., Peschek J., Kastenmuller A., Zou J., Hanzlik M., Haslbeck M., Rappsilber J., Buchner J., Weinkauff S. Multiple molecular architectures of the eye lens chaperone B-crystallin elucidated by a triple hybrid approach // Proc. Natl. Acad. Sci. — 2011. — Vol. 108, №51 — P. 20491–20496.

70. Jehle S., Rajagopal P., Bardiaux B., Markovic S., Kühne R., Stout J.R., Higman V.A., Klevit R.E., Rossum B.J. Van, Oschkinat H. Solid-state NMR and SAXS studies provide a structural basis for the activation of α B-crystallin oligomers // Nat. Struct. Mol. Biol. — 2010. — Vol. 17, №9 — P. 1037–1042.

71. Jehle S., Vollmar B.S., Bardiaux B., Dove K.K., Rajagopal P., Gonen T., Oschkinat H., Klevit R.E. N-terminal domain of α B-crystallin provides a conformational switch for multimerization and structural heterogeneity. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. — 2011. — Vol. 108, №16 — P. 6409–6414.

72. Kaiser C.J.O., Peters C., Schmid P.W.N., Stavropoulou M., Zou J., Dahiya V., Mymrikov E. V., Rockel B., Asami S., Haslbeck M., Rappsilber J., Reif B., Zacharias M., Buchner J., Weinkauff S. The structure and oxidation of the eye lens chaperone α A-crystallin // Nat. Struct. Mol. Biol. — 2019. — Vol. 26, №12 — P. 1141–1150.

73. Landry J., Chrétien P., Laszlo A., Lambert H. Phosphorylation of HSP27 during development and decay of thermotolerance in Chinese hamster cells // J. Cell. Physiol. — 1991. — Vol. 147, №1 — P. 93–101.

74. Ito H., Okamoto K., Nakayama H., Isobe T., Kato K. Phosphorylation of α B-crystallin in response to various

- types of stress // *J. Biol. Chem.* — 1997. — Vol. 272, №47 — P. 29934–29941.
75. *Kostenko S., Moens U.* Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2009. — Vol. 66, №20 — P. 3289–3307.
76. *Simon S., Dimitrova V., Gibert B., Virost S., Mounier N., Nivon M., Kretz-Remy C., Corset V., Mehlen P., Arrigo A.P.* Analysis of the Dominant Effects Mediated by Wild Type or R120G Mutant of α B-crystallin (HspB5) towards Hsp27 (HspB1) // *PLoS One* — 2013. — Vol. 8, №8 — P. 26–29.
77. *Rogalla T., Ehrnsperger M., Preville X., Kotlyarov A., Lutsch G., Ducasse C., Paul C., Wieske M., Arrigo A.P., Buchner J., Gaestel M.* Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor by phosphorylation // *J. Biol. Chem.* — 1999. — Vol. 274, №27 — P. 18947–18956.
78. *Peschek J., Braun N., Rohrberg J., Back K.C., Kriehuber T., Kastentmuller A., Weinkauff S., Buchner J.* Regulated structural transitions unleash the chaperone activity of α B-crystallin // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2013. — Vol. 110, №40 — P. 3780–3789.
79. *Ecroyd H., Meehan S., Horwitz J., Aquilina J.A., Benesch J.L.P., Robinson C.V., Macphree C.E., Carver J.A.* Mimicking phosphorylation of α B-crystallin affects its chaperone activity // *Biochem. J.* — 2006. — Vol. 401, №1 — P. 129–141.
80. *Shashidharamurthy R., Koteiche H.A., Dong J., Mchaourab H.S.* Mechanism of chaperone function in small heat shock proteins: Dissociation of the HSP27 oligomer is required for recognition and binding of destabilized T4 lysozyme // *J. Biol. Chem.* — 2005. — Vol. 280, №7 — P. 5281–5289.
81. *Panasenko O.O., Nebi A.S., Bukach O. V., Marston S.B., Gusev N.B.* Structure and properties of avian small heat shock protein with molecular weight 25 kDa // *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* — 2002. — Vol. 1601, №1 — P. 64–74.
82. *Shemetov A.A., Seit-Nebi A.S., Bukach O. V., Gusev N.B.* Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase inhibits chaperone-like activity of human HSP22 in vitro // *Biochem.* — 2008. — Vol. 73, №2 — P. 200–208.
83. *Bukach O. V., Seit-Nebi A.S., Marston S.B., Gusev N.B.* Some properties of human small heat shock protein Hsp20 (HspB6) // *Eur. J. Biochem.* — 2004. — Vol. 271, №2 — P. 291–302.
84. *Horwitz J.* Alpha-crystallin // *Exp. Eye Res.* — 2003. — Vol. 76, №2 — P. 145–153.
85. *Muranova L.K., Sudnitsyna M. V., Gusev N.B.* α B-Crystallin Phosphorylation: Advances and Problems // *Biochem.* — 2018. — Vol. 83, №10 — P. 1196–1206.
86. *Augusteyn R.C.* Dissociation is not required for α -crystallin's chaperone function // *Exp. Eye Res.* — 2004. — Vol. 79, №6 — P. 781–784.
87. *Benesch J.L.P., Ayoub M., Robinson C. V., Aquilina J.A.* Small heat shock protein activity is regulated by variable oligomeric substructure // *J. Biol. Chem.* — 2008. — Vol. 283, №42 — P. 28513–28517.
88. *Aquilina J.A., Benesch J.L.P., Ding L.L., Yaron O., Horwitz J., Robinson C. V.* Phosphorylation of α B-crystallin alters chaperone function through loss of dimeric substructure // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Vol. 279, №27 — P. 28675–28680.
89. *Stengel F., Baldwin A.J., Painter A.J., Jaya N., Basha E., Kay L.E., Vierling E., Robinson C. V., Benesch J.L.P.* Quaternary dynamics and plasticity underlie small heat shock protein chaperone function // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2010. — Vol. 107, №5 — P. 2007–2012.
90. *Sharma K.K., Kumar R.S., Kumar G.S., Quinn P.T.* Synthesis and characterization of a peptide identified as a functional element in alphaA-crystallin. // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275, №6 — P. 3767–3771.
91. *Bhattacharyya J., Udupa E.G.P., Wang J., Sharma K.K.* Mini- α B-crystallin: A functional element of α B-crystallin with chaperone-like activity // *Biochemistry* — 2006. — Vol. 45, №9 — P. 3069–3076.
92. *Clark J.I.* Functional sequences in human alphaB crystallin // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* — 2016. — Vol. 1860, №1 — P. 240–245.
93. *Lelj-Garolla B., Mauk A.G.* Roles of the N- and C-terminal sequences in Hsp27 self-association and chaperone activity // *Protein Sci.* — 2012. — Vol. 21, №1 — P. 122–133.

94. Kim R., Lai L., Lee H.-H., Cheong G.-W., Kim K.K., Wu Z., Yokota H., Marqusee S., Kim S.-H. On the mechanism of chaperone activity of the small heat-shock protein of *Methanococcus jannaschii* // Proc. Natl. Acad. Sci. — 2003. — Vol. 100, №14 — P. 8151–8155.
95. Kelley P.B., Abraham E.C. Thermally induced disintegration of the oligomeric structure of α B-crystallin mutant F28S is associated with diminished chaperone activity // Mol. Cell. Biochem. — 2003. — Vol. 252, №1–2 — P. 273–278.
96. Nefedova V. V., Sudnitsyna M. V., Strelkov S. V., Gusev N.B. Structure and properties of G84R and L99M mutants of human small heat shock protein HspB1 correlating with motor neuropathy // Arch. Biochem. Biophys. — 2013. — Vol. 538, №1 — P. 16–24.
97. Muranova L.K., Weeks S.D., Strelkov S. V., Gusev N.B. Characterization of mutants of human small heat shock protein HspB1 carrying replacements in the N-terminal domain and associated with hereditary motor neuron diseases // PLoS One — 2015. — Vol. 10, №5 — P. 1–24.
98. Eifert C., Burgio M.R., Bennett P.M., Salerno J.C., Koretz J.F. N-terminal control of small heat shock protein oligomerization: Changes in aggregate size and chaperone-like function // Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics — 2005. — Vol. 1748, №2 — P. 146–156.
99. Basha E., Friedrich K.L., Vierling E. The N-terminal arm of small heat shock proteins is important for both chaperone activity and substrate specificity // J. Biol. Chem. — 2006. — Vol. 281, №52 — P. 39943–39952.
100. Shi J., Koteiche H.A., Mchaourab H.S., Stewart P.L. Cryoelectron microscopy and EPR analysis of engineered symmetric and polydisperse Hsp16.5 assemblies reveals determinants of polydispersity and substrate binding // J. Biol. Chem. — 2006. — Vol. 281, №52 — P. 40420–40428.
101. Hayashi J., Carver J.A. The multifaceted nature of α B-crystallin // Cell Stress Chaperones — 2020. — Vol. 25, №4 — P. 639–654.
102. Waters E.R., Vierling E. Plant small heat shock proteins – evolutionary and functional diversity // New Phytol. — 2020. — Vol. 227, №1 — P. 24–37.
103. Arrigo A.-P. Human small heat shock proteins: Protein interactomes of homo- and hetero-oligomeric complexes: An update // FEBS Lett. — 2013. — Vol. 587, №13 — P. 1959–1969.
104. Mymrikov E. V., Riedl M., Peters C., Weinkauff S., Haslbeck M., Buchner J. Regulation of small heat-shock proteins by hetero-oligomer formation // J. Biol. Chem. — 2020. — Vol. 295, №1 — P. 158–169.
105. Bukach O. V., Glukhova A.E., Seit-Nebi A.S., Gusev N.B. Heterooligomeric complexes formed by human small heat shock proteins HspB1 (Hsp27) and HspB6 (Hsp20) // Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics — 2009. — Vol. 1794, №3 — P. 486–495.
106. Mymrikov E. V., Seit-Nebi A.S., Gusev N.B. Heterooligomeric complexes of human small heat shock proteins // Cell Stress Chaperones — 2012. — Vol. 17, №2 — P. 157–169.
107. Haslbeck M., Peschek J., Buchner J., Weinkauff S. Structure and function of α -crystallins: Traversing from in vitro to in vivo // Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. — 2016. — Vol. 1860, №1 — P. 149–166.
108. Ryazantsev S.N., Poliansky N.B., Chebotareva N.A., Muranov K.O. 3D structure of the native α -crystallin from bovine eye lens // Int. J. Biol. Macromol. — 2018. — Vol. 117, — P. 1289–1298.
109. Panda A.K., Nandi S.K., Chakraborty A., Nagaraj R.H., Biswas A. Differential role of arginine mutations on the structure and functions of α -crystallin // Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. — 2016. — Vol. 1860, №1 — P. 199–210.
110. Muranova L.K., Strelkov S. V., Gusev N.B. Effect of cataract-associated mutations in the N-terminal domain of α B-crystallin (HspB5) // Exp. Eye Res. — 2020. — Vol. 197, №108091 — P. 1–10.
111. Augusteyn R.C. α -crystallin polymers and polymerization: The view from down under // Int. J. Biol. Macromol. — 1998. — Vol. 22, №3–4 — P. 253–262.
112. Morris A.M., Aquilina J.A. Evidence for specific subunit distribution and interactions in the quaternary structure of α -crystallin // Proteins Struct. Funct. Bioinforma. — 2010. — Vol. 78, №11 — P. 2546–2553.
113. Kato K., Shinohara H., Goto S., Inaguma Y., Morishita R., Asano T. Copurification of small heat shock protein with α B crystallin from human skeletal muscle // J. Biol. Chem. — 1992. — Vol. 267, №11 — P. 7718–

114. Zantema A.L.T., Jong E.D.E. de, Lardenoije R., EB A.J. van der. Expression Protein Adenovirus-Transformed cells // 1989. — Vol. 63, №8 — P. 3368–3375.
115. Zantema A., Verlaan-De Vries M., Maasdam D., Bol S., Eb A. Van der. Heat shock protein 27 and α B-crystallin can form a complex, which dissociates by heat shock // J. Biol. Chem. — 1992. — Vol. 267, №18 — P. 12936–12941.
116. Aquilina J.A., Shrestha S., Morris A.M., Ecroyd H. Structural and functional aspects of hetero-oligomers formed by the small heat shock proteins α B-crystallin and HSP27 // J. Biol. Chem. — 2013. — Vol. 288, №19 — P. 13602–13609.
117. Weeks S.D., Baranova E. V., Heirbaut M., Beelen S., Shkumatov A. V., Gusev N.B., Strelkov S. V. Molecular structure and dynamics of the dimeric human small heat shock protein HSPB6 // J. Struct. Biol. — 2014. — Vol. 185, №3 — P. 342–354.
118. Heirbaut M., Lermyte F., Martin E.M., Beelen S., Verschuieren T., Sobott F., Strelkov S. V., Weeks S.D. The preferential heterodimerization of human small heat shock proteins HSPB1 and HSPB6 is dictated by the N-terminal domain // Arch. Biochem. Biophys. — 2016. — Vol. 610, №1 — P. 41–50.
119. Heirbaut M., Lermyte F., Martin E.M., Beelen S., Sobott F., Strelkov S. V., Weeks S.D. Specific sequences in the N-terminal domain of human small heat-shock protein HSPB6 dictate preferential hetero-oligomerization with the orthologue HSPB1 // J. Biol. Chem. — 2017. — Vol. 292, №24 — P. 9944–9957.
120. Sun X., Fontaine J.M., Rest J.S., Shelden E.A., Welsh M.J., Benndorf R. Interaction of Human HSP22 (HSPB8) with Other Small Heat Shock Proteins // J. Biol. Chem. — 2004. — Vol. 279, №4 — P. 2394–2402.
121. Fontaine J.M., Sun X., Benndorf R., Welsh M.J. Interactions of HSP22 (HSPB8) with HSP20, α B-crystallin, and HSPB3 // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2005. — Vol. 337, №3 — P. 1006–1011.
122. Fontaine J.-M., Sun X., Hoppe A.D., Simon S., Vicart P., Welsh M.J., Benndorf R. Abnormal small heat shock protein interactions involving neuropathy-associated HSP22 (HSPB8) mutants // FASEB J. — 2006. — Vol. 20, №12 — P. 2168–2170.
123. Shemetov A.A., Seit-Nebi A.S., Gusev N.B. Structure, properties, and functions of the human small heat-shock protein HSP22 (HspB8, H11, E2IG1): A critical review // J. Neurosci. Res. — 2008. — Vol. 86, №2 — P. 264–269.
124. Muranova L.K., Shatov V.M., Bukach O. V., Gusev N.B. Cardio-Vascular Heat Shock Protein (cvHsp, HspB7), an Unusual Representative of Small Heat Shock Protein Family // Biochem. — 2021. — Vol. 86, №1 — P. 1–11.
125. Muranova L.K., Shatov V.M., Slushchev A. V., Gusev N.B. Quaternary structure and hetero-oligomerization of recombinant human small heat shock protein hspb7 (Cvhsp) // Int. J. Mol. Sci. — 2021. — Vol. 22, №15 — P. 1–15.
126. Kazakov A.S., Markov D.I., Gusev N.B., Levitsky D.I. Thermally induced structural changes of intrinsically disordered small heat shock protein Hsp22 // Biophys. Chem. — 2009. — Vol. 145, №2–3 — P. 79–85.
127. Chernik I.S., Seit-Nebi A.S., Marston S.B., Gusev N.B. Small heat shock protein Hsp20 (HspB6) as a partner of 14-3-3 γ // Mol. Cell. Biochem. — 2007. — Vol. 295, №1–2 — P. 9–17.
128. Carra S., Seguin S.J., Landry J. HspB8 and Bag3: A new chaperone complex targeting misfolded proteins to macroautophagy // Autophagy — 2008. — Vol. 4, №2 — P. 237–239.
129. Stürner E., Behl C. The Role of the Multifunctional BAG3 Protein in Cellular Protein Quality Control and in Disease // Front. Mol. Neurosci. — 2017. — Vol. 10, №17 — P. 1–14.
130. Aitken A. 14-3-3 proteins: A historic overview // Semin. Cancer Biol. — 2006. — Vol. 16, №3 — P. 162–172.
131. Fu H., Subramanian R.R., Masters S.C. 14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. — 2000. — Vol. 40, №1 — P. 617–647.
132. Qian J., Ren X., Wang X., Zhang P., Jones W.K., Molkentin J.D., Fan G.-C., Kranias E.G. Blockade of Hsp20 Phosphorylation Exacerbates Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury by Suppressed Autophagy and Increased Cell

- Death // *Circ. Res.* — 2009. — Vol. 105, №12 — P. 1223–1231.
133. Liu G.S., Gardner G., Adly G., Jiang M., Cai W.F., Lam C.K., Alogaili F., Robbins N., Rubinstein J., Kranias E.G. A novel human S10F-Hsp20 mutation induces lethal peripartum cardiomyopathy // *J. Cell. Mol. Med.* — 2018. — Vol. 22, №8 — P. 3911–3919.
134. Liu G.-S., Zhu H., Cai W.-F., Wang X., Jiang M., Essandoh K., Vafiadaki E., Haghghi K., Lam C.K., Gardner G., Adly G., Nicolaou P., Sanoudou D., Liang Q., Rubinstein J., Fan G.-C., Kranias E.G. Regulation of BECN1-mediated autophagy by HSPB6: Insights from a human HSPB6 S10F mutant // *Autophagy* — 2018. — Vol. 14, №1 — P. 80–97.
135. Nicolaou P., Knöll R., Haghghi K., Fan G.C., Dorn G.W., Hasenfuß G., Kranias E.G. Human mutation in the anti-apoptotic heat shock protein 20 abrogates its cardioprotective effects // *J. Biol. Chem.* — 2008. — Vol. 283, №48 — P. 33465–33471.
136. Mathieson T., Franken H., Kosinski J., Kurzawa N., Zinn N., Sweetman G., Poeckel D., Ratnu V.S., Schramm M., Becher I., Steidel M., Noh K.M., Bergamini G., Beck M., Bantscheff M., Savitski M.M. Systematic analysis of protein turnover in primary cells // *Nat. Commun.* — 2018. — Vol. 9, №1 — P. 1–10.
137. Martin A.F. Turnover of cardiac troponin subunits. Kinetic evidence for a precursor pool of troponin-I // *J. Biol. Chem.* — 1981. — Vol. 256, №2 — P. 964–968.
138. Ganassi M., Mateju D., Bigi I., Mediani L., Poser I., Lee H.O., Seguin S.J., Morelli F.F., Vinet J., Leo G., Pansarasa O., Cereda C., Poletti A., Alberti S., Carra S. A Surveillance Function of the HSPB8-BAG3-HSP70 Chaperone Complex Ensures Stress Granule Integrity and Dynamism // *Mol. Cell* — 2016. — Vol. 63, №5 — P. 796–810.
139. Cristofani R., Piccolella M., Crippa V., Tedesco B., Marelli M.M., Poletti A., Moretti R.M. The role of HSPB8, a component of the chaperone-assisted selective autophagy machinery, in cancer // *Cells* — 2021. — Vol. 10, №2 — P. 1–23.
140. Rauch J.N., Tse E., Freilich R., Mok S.-A., Makley L.N., Southworth D.R., Gestwicki J.E. BAG3 Is a Modular, Scaffolding Protein that physically Links Heat Shock Protein 70 (Hsp70) to the Small Heat Shock Proteins // *J. Mol. Biol.* — 2017. — Vol. 429, №1 — P. 128–141.
141. Marzullo L., Turco M.C., Uversky V.N. What's in the BAGs? Intrinsic disorder angle of the multifunctionality of the members of a family of chaperone regulators // *J. Cell. Biochem.* — 2022. — Vol. 123, №1 — P. 22–42.
142. Shemetov A.A., Gusev N.B. Biochemical characterization of small heat shock protein HspB8 (Hsp22)-Bag3 interaction // *Arch. Biochem. Biophys.* — 2011. — Vol. 513, №1 — P. 1–9.
143. Morelli F.F., Mediani L., Heldens L., Bertacchini J., Bigi I., Carrà A.D., Vinet J., Carra S. An interaction study in mammalian cells demonstrates weak binding of HSPB2 to BAG3, which is regulated by HSPB3 and abrogated by HSPB8 // *Cell Stress Chaperones* — 2017. — Vol. 22, №4 — P. 531–540.
144. Hishiya A., Salman M.N., Carra S., Kampinga H.H., Takayama S. BAG3 Directly Interacts with Mutated alphaB-Crystallin to Suppress Its Aggregation and Toxicity // *PLoS One* — 2011. — Vol. 6, №3 — P. e16828.
145. Lent J. Van, Alderson T.R., Adriaenssens E., Asselbergh B., Priti I., Louis J.M., Timmerman V., Baldwin A.J., Gastall H.Y., Marielle A.W., Benesch J.L.P. A weakened interface in the P 182 L variant of HSP 27 associated with severe Charcot-Marie-Tooth neuropathy causes aberrant binding to interacting proteins // 2021. — P. 1–23.
146. Fang X., Bogomolovas J., Trexler C., Chen J. The BAG3-dependent and -independent roles of cardiac small heat shock proteins // *JCI insight* — 2019. — Vol. 4, №4 — P. 1–12.
147. Esslinger U., Garnier S., Korniat A., Proust C., Kararigas G., Müller-Nurasyid M., Empana J.-P., Morley M.P., Perret C., Stark K., Bick A.G., Prasad S.K., Kriebel J., Li J., Tirt L., Strauch K., O'Regan D.P., Marguiles K.B., Seidman J.G., et al. Exome-wide association study reveals novel susceptibility genes to sporadic dilated cardiomyopathy // *PLoS One* — 2017. — Vol. 12, №3 — P. e0172995.
148. Vos M.J., Zijlstra M.P., Kanon B., Waarde-Verhagen M.A.W.H. van, Brunt E.R.P., Oosterveld-Hut H.M.J., Carra S., Sibon O.C.M., Kampinga H.H. HSPB7 is the most potent polyQ aggregation suppressor within the HSPB family of molecular chaperones // *Hum. Mol. Genet.* — 2010. — Vol. 19, №23 — P. 4677–4693.
149. Ulbricht A., Gehlert S., Leciejewski B., Schiffer T., Bloch W., Höhfeld J. Induction and adaptation of

- chaperone-assisted selective autophagy CASA in response to resistance exercise in human skeletal muscle // *Autophagy* — 2015. — Vol. 11, №3 — P. 538–546.
150. *Mercer E.J., Lin Y.F., Cohen-Gould L., Evans T.* Hspb7 is a cardioprotective chaperone facilitating sarcomeric proteostasis // *Dev. Biol.* — 2018. — Vol. 435, №1 — P. 41–55.
151. *Juo L.Y., Liao W.C., Shih Y.L., Yang B.Y., Liu A.B., Yan Y.T.* HSPB7 interacts with dimerized FLNC and its absence results in progressive myopathy in skeletal muscles // *J. Cell Sci.* — 2016. — Vol. 129, №8 — P. 1661–1670.
152. *Sluchanko N.N., Sudnitsyna M. V., Chernik I.S., Seit-Nebi A.S., Gusev N.B.* Phosphomimicking mutations of human 14-3-3 ζ affect its interaction with tau protein and small heat shock protein HspB6 // *Arch. Biochem. Biophys.* — 2011. — Vol. 506, №1 — P. 24–34.
153. *Mymrikov E. V., Bukach O. V., Seit-Nebi A.S., Gusev N.B.* The pivotal role of the β 7 strand in the intersubunit contacts of different human small heat shock proteins // *Cell Stress Chaperones* — 2010. — Vol. 15, №4 — P. 365–377.
154. *Asthana A., Raman B., Ramakrishna T., Rao C.M.* Structural Aspects and Chaperone Activity of Human HspB3: Role of the «C-Terminal Extension» // *Cell Biochem. Biophys.* — 2012. — Vol. 64, №1 — P. 61–72.
155. *Schaub M.C., Perry S. V.* The relaxing protein system of striated muscle. Resolution of the troponin complex into inhibitory and calcium ion-sensitizing factors and their relationship to tropomyosin. // *Biochem. J.* — 1969. — Vol. 115, №5 — P. 993–1004.
156. *Shatov V.M., Gusev N.B.* Physico-chemical properties of two point mutants of small heat shock protein HspB6 (Hsp20) with abrogated cardioprotection // *Biochimie* — 2020. — Vol. 174, — P. 126–135.
157. *Benfield C.T.O., Mansur D.S., McCoy L.E., Ferguson B.J., Bahar M.W., Oldring A.P., Grimes J.M., Stuart D.I., Graham S.C., Smith G.L.* Mapping the I κ B kinase β (IKK β)-binding interface of the B14 protein, a vaccinia virus inhibitor of IKK β -mediated activation of nuclear factor κ B // *J. Biol. Chem.* — 2011. — Vol. 286, №23 — P. 20727–20735.
158. *Mirdita M., Schütze K., Moriwaki Y., Heo L., Ovchinnikov S., Steinegger M.* ColabFold: making protein folding accessible to all // *Nat. Methods* — 2022. — Vol. 19, №6 — P. 679–682.
159. *Schägger H.* Tricine-SDS-PAGE // *Nat. Protoc.* — 2006. — Vol. 1, №1 — P. 16–22.
160. *Davis B.J.* DISC ELECTROPHORESIS - II METHOD AND APPLICATION TO HUMAN SERUM PROTEINS* // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2006. — Vol. 121, №2 — P. 404–427.
161. *Yang Z., Wang Y., Lu Y., Zhao X.* Molecular characterization of rat cvHsp/HspB7 in vitro and its dynamic molecular architecture // *Mol. Med. Rep.* — 2011. — Vol. 4, №1 — P. 105–111.
162. *Wu T., Mu Y., Bogomolovas J., Fang X., Veevers J., Nowak R.B., Pappas C.T., Gregorio C.C., Evans S.M., Fowler V.M., Chen J.* HSPB7 is indispensable for heart development by modulating actin filament assembly // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2017. — Vol. 114, №45 — P. 11956–11961.
163. *Golenhofen N., Perng M. Der, Quinlan R.A., Drenckhahn D.* Comparison of the small heat shock proteins α B-crystallin, MKBP, HSP25, HSP20, and cvHSP in heart and skeletal muscle // *Histochem. Cell Biol.* — 2000. — Vol. 122, №5 — P. 415–425.
164. *Smilgies D.M., Folta-Stogniew E.* Molecular weight-gyration radius relation of globular proteins: A comparison of light scattering, small-angle X-ray scattering and structure-based data // *J. Appl. Crystallogr.* — 2015. — Vol. 48, — P. 1604–1606.
165. *Vangone A., Bonvin A.M.J.J.* Contacts-based prediction of binding affinity in protein–protein complexes // *Elife* — 2015. — Vol. 4, №JULY2015 — P. 1–15.
166. *Hochberg G.K.A., Benesch J.L.P.* Dynamical structure of α B-crystallin // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* — 2014. — Vol. 115, №1 — P. 11–20.
167. *Jovcevski B., Kelly M.A., Aquilina J.A., Benesch J.L.P., Ecroyd H.* Evaluating the Effect of Phosphorylation on the Structure and Dynamics of Hsp27 Dimers by Means of Ion Mobility Mass Spectrometry // *Anal. Chem.* — 2017. — Vol. 89, №24 — P. 13275–13282.
168. *Weeks S.D., Muranova L.K., Heirbaut M., Beelen S., Strelkov S. V., Gusev N.B.* Characterization of human

small heat shock protein HSPB1 α -crystallin domain localized mutants associated with hereditary motor neuron diseases // *Sci. Rep.* — 2018. — Vol. 8, №1 — P. 1–15.

169. *Adriaenssens E., Geuens T., Baets J., Echaniz-Laguna A., Timmerman V.* Novel insights in the disease biology of mutant small heat shock proteins in neuromuscular diseases // *Brain* — 2017. — Vol. 140, №10 — P. 2541–2549.

170. *Fan G.C., Kranias E.G.* Small heat shock protein 20 (HspB6) in cardiac hypertrophy and failure // *J. Mol. Cell. Cardiol.* — 2011. — Vol. 51, №4 — P. 574–577.

171. *Rust H.L., Thompson P.R.* Kinase Consensus Sequences: A Breeding Ground for Crosstalk // *ACS Chem. Biol.* — 2011. — Vol. 6, №9 — P. 881–892.

172. *Aquilina J.A., Watt S.J.* The N-terminal domain of α B-crystallin is protected from proteolysis by bound substrate // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2007. — Vol. 353, №4 — P. 1115–1120.

173. *Krief S., Faivre J.F., Robert P., Douarin B. Le, Brument-Larignon N., Lefrère I., Bouzyk M.M., Anderson K.M., Greller L.D., Tobin F.L., Souchet M., Bril A.* Identification and characterization of cvHsp. A novel human small stress protein selectively expressed in cardiovascular and insulin-sensitive tissues // *J. Biol. Chem.* — 1999. — Vol. 274, №51 — P. 36592–36600.

174. *Surya S.L., Long M.J.C., Urul D.A., Zhao Y., Mercer E.J., Eisaid I.M., Evans T., Aye Y.* Cardiovascular Small Heat Shock Protein HSPB7 Is a Kinetically Privileged Reactive Electrophilic Species (RES) Sensor // *ACS Chem. Biol.* — 2018. — Vol. 13, №7 — P. 1824–1831.

175. *Wu D., Vonk J.J., Salles F., Vonk D., Haslbeck M., Melki R., Bergink S., Kampinga H.H.* The N terminus of the small heat shock protein HSPB7 drives its polyQ aggregation-suppressing activity // *J. Biol. Chem.* — 2019. — Vol. 294, №25 — P. 9985–9994.

176. *Islam M., Diwan A., Mani K.* Come Together: Protein Assemblies, Aggregates and the Sarcostat at the Heart of Cardiac Myocyte Homeostasis // *Front. Physiol.* — 2020. — Vol. 11, №June — P. 1–18.

177. *Carra S., Seguin S.J., Lambert H., Landry J.* HspB8 chaperone activity toward poly(Q)-containing proteins depends on its association with Bag3, a stimulator of macroautophagy // *J. Biol. Chem.* — 2008. — Vol. 283, №3 — P. 1437–1444.

178. *Carra S., Sivilotti M., Chávez Zobel A.T., Lambert H., Landry J.* HspB8, a small heat shock protein mutated in human neuromuscular disorders, has in vivo chaperone activity in cultured cells // *Hum. Mol. Genet.* — 2005. — Vol. 14, №12 — P. 1659–1669.

179. *Kim M. V., Kasakov A.S., Seit-Nebi A.S., Marston S.B., Gusev N.B.* Structure and properties of K141E mutant of small heat shock protein HSP22 (HspB8, H11) that is expressed in human neuromuscular disorders // *Arch. Biochem. Biophys.* — 2006. — Vol. 454, №1 — P. 32–41.

180. *Wu T., Mu Y., Bogomolovas J., Fang X., Veevers J., Nowak R.B., Pappas C.T., Gregorio C.C., Evans S.M., Fowler V.M., Chen J.* HSPB7 is indispensable for heart development by modulating actin filament assembly // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2017. — Vol. 114, №45 — P. 11956–11961.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность д.б.н. Случанко Н.Н. (ФИЦ Биотехнологии РАН) – за проведение SEC-MALS экспериментов и помощь в моделировании структур ACD, к.х.н. М.В. Серебряковой (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского) за проведение масс-спектрометрического анализа, к.б.н. Л.К. Мурановой и А.В. Харитонову за помощь в проведении практической части, ценные советы и поддержку.

Приложение 1

Последовательности праймеров, использованных в работе.

Название праймера	Последовательность
HspB1Δ26-30_fw1	CGGGTCCTCAACGACAGGAGC
HspB1Δ26-30_rev1	GCAGCCCGAAGGCCTGATGCGGGTACCAGTCGCGGAAG
HspB1Δ26-30_fw2	CGACTGGTACCCGCATCAGGCCTTCGGGCTGC
HspB1Δ26-30_rev2	ATTA <u>ACTCGAGT</u> TACTTGGCGGCAGTC
T7-prom long	TACGACTCACTATAGGGAGACC
T7-term long	ATGCTAGTTATGCTCAGCGGTG
HspB1-ACD-84-fw-NdeI	GATCCATATGGGGGTCTCGGAGATCCGGCAC
HspB1-ACD-170-rev-XhoI	GATCCTCGAGTTAGGGCATGGGGGCCTCCACGG
HspB5-ACD-64-fw-NdeI	GATCCATATGGGACTCTCAGAGATGCGCCT
HspB5-ACD-150-rev-XhoI	GATCCTCGAGTTATTTCCCTTGGTCCATTCACAGT
HspB6-ACD-64-fw-NdeI	GATCCATATGGTTCGCCAGGTGCCGACGGAC
HspB6-ACD-149-rev-XhoI	GATCCTCGAGTTACGCTGGTGC GGCTGGATGGA
HspB7-ACD-71-fw-NdeI	GATCCATATGGGGGCAGGCAACATCAAGACCCTA
HspB7-ACD-154-rev-XhoI	GATCCTCGAGTTAGTGACGCCGTGCCCGGATAGT
HspB8-ACD-85-fw-NdeI	GATCCATATGGGCAGGACCCCCCACCCTTC
HspB8-ACD-171-rev-XhoI	GATCCTCGAGTTAGACCTGGGGAGCTTCGATGATCAGC

*Нижним подчеркиванием отмечены сайты рестрикции

Приложение 2

Детали экспрессии и очистки белков

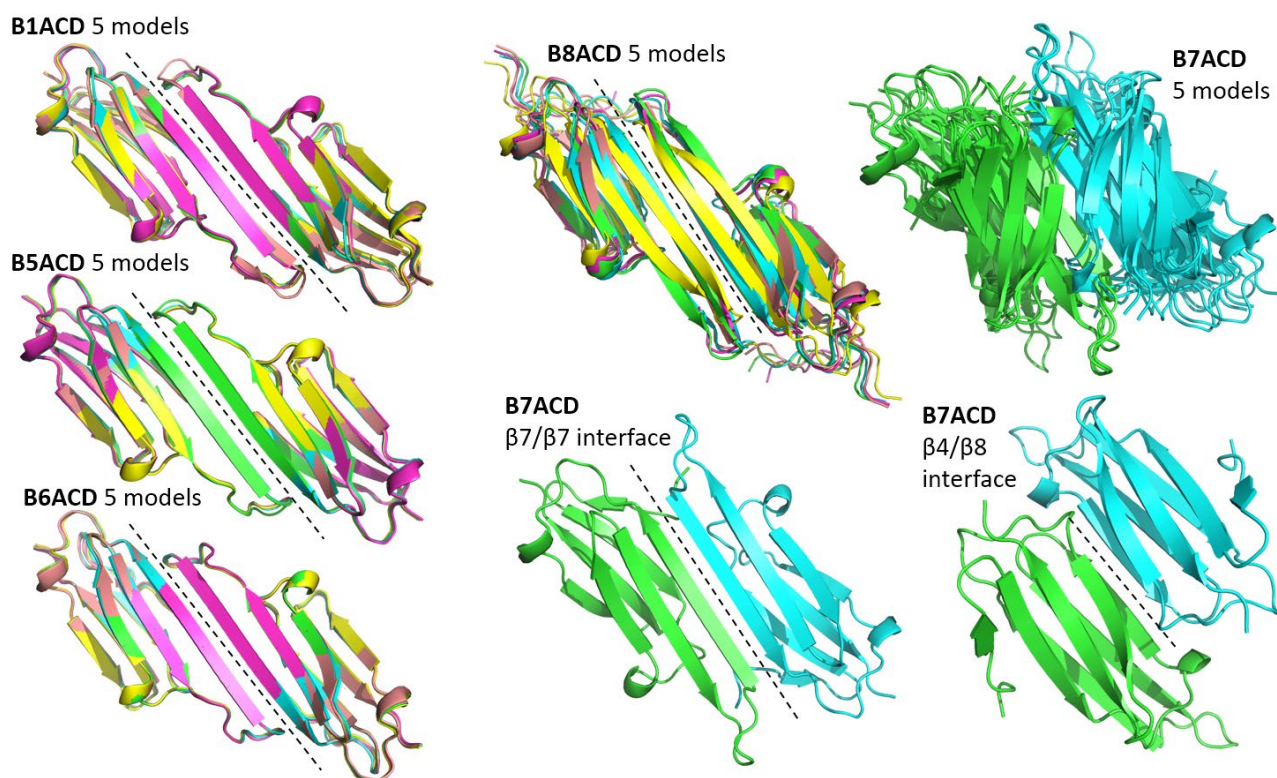
Белок	Плазмида	Штамм экспрессионных бактерий	Метод индукции	Метод хроматографической очистки	Выход (мг) белка на 1 л культуры
HspB1WT	pET23a	BL21(DE3)	Автоиндукция (3xLB)	Ионообменная хр-я, Гель-фильтрация	40
HspB1R27A	pET22b	BL21(DE3)PLysS	Автоиндукция (3xLB)	Ионообменная хр-я, Гель-фильтрация	120
HspB1Δ26-30	pET23b	BL21(DE3)	Автоиндукция (3xLB)	Ионообменная хр-я, Гель-фильтрация	64
HspB5WT*		-	-	Ионообменная хр-я, Гель-фильтрация	-
HspB5R22A	pET22b	BL21(DE3)PLysS	Индукция IPTG (0.5 мМ)**	Ионообменная хр-я, Гель-фильтрация	56
HspB5Δ21-25	pET22b	BL21(DE3)	Автоиндукция (3xLB)	Ионообменная хр-я, Гель-фильтрация	155
HspB6WT	pET23b	BL21(DE3)	Автоиндукция (3xLB)	Гидрофобная хроматография, Гель-фильтрация	94
HspB6R27A	pET22b	BL21(DE3)PLysS	Индукция IPTG (0.5 мМ)	Гидрофобная хроматография, Гель-фильтрация	14
HspB6Δ26-30	pET22b	BL21(DE3)	Автоиндукция (3xLB)	Гидрофобная хроматография, Гель-фильтрация	64
HspB6S10F	pET23b	BL21(DE3)PLysS	Автоиндукция (3xLB)	Гидрофобная хроматография, Гель-фильтрация	55
HspB6P20L	pET23b	BL21(DE3)PLysS	Автоиндукция (3xLB)	Гидрофобная хроматография, Гель-фильтрация	53
HspB7WT	pET23b	Rosetta2(DE3)PLysS	Автоиндукция (3xLB) при 20 °С	Гидрофобная хроматография, Гель-фильтрация	10
HspB7Δ13	pET23b	Rosetta2(DE3)PLysS	Автоиндукция (3xLB) при 20 °С	Гидрофобная хроматография, Гель-фильтрация	10
HspB7ΔSer	pET23b	Rosetta2(DE3)PLysS	Автоиндукция (3xLB) при 20 °С	Гидрофобная хроматография, Гель-фильтрация	15
HspB8WT	pET23b	BL21(DE3)***	Автоиндукция (3xLB)	Гидрофобная хроматография, Гель-фильтрация	79
HspB8Cys	pET23b	BL21(DE3)	Индукция IPTG в SB (0.5 мМ)	Гидрофобная хроматография, Гель-фильтрация	30
B1ACD	pET23a	Rosetta2(DE3)PLysS	Автоиндукция (3xLB)	Ионообменная хр-я, Гель-фильтрация	40
B5ACD	pET23a	Rosetta2(DE3)PLysS	Автоиндукция (3xLB)	Ионообменная хр-я, Гель-фильтрация	35
B6ACD	pET23a	Rosetta2(DE3)PLysS	Автоиндукция (3xLB)	Ионообменная хр-я, Гель-фильтрация	27
B7ACD	pET23a	Rosetta2(DE3)PLysS	Автоиндукция (3xLB)	Ионообменная хр-я, Гель-фильтрация	20
B8ACD	pET23a	Rosetta2(DE3)PLysS	Автоиндукция (3xLB)	Ионообменная хр-я, Гель-фильтрация	35
BAG3	pET23a	Rosetta2(DE3)PLysS	Индукция IPTG (1мМ)	Ионообменная хр-я, Гель-фильтрация	15
14-3-3γ	pET23a	BL21(DE3)PLysS	Индукция IPTG (1мМ)	Ионообменная хр-я, Гель-фильтрация	20

* - Белок был любезно предоставлен Мурановой Л.К.

** - В скобках указана конечная концентрация индуктора в культуре

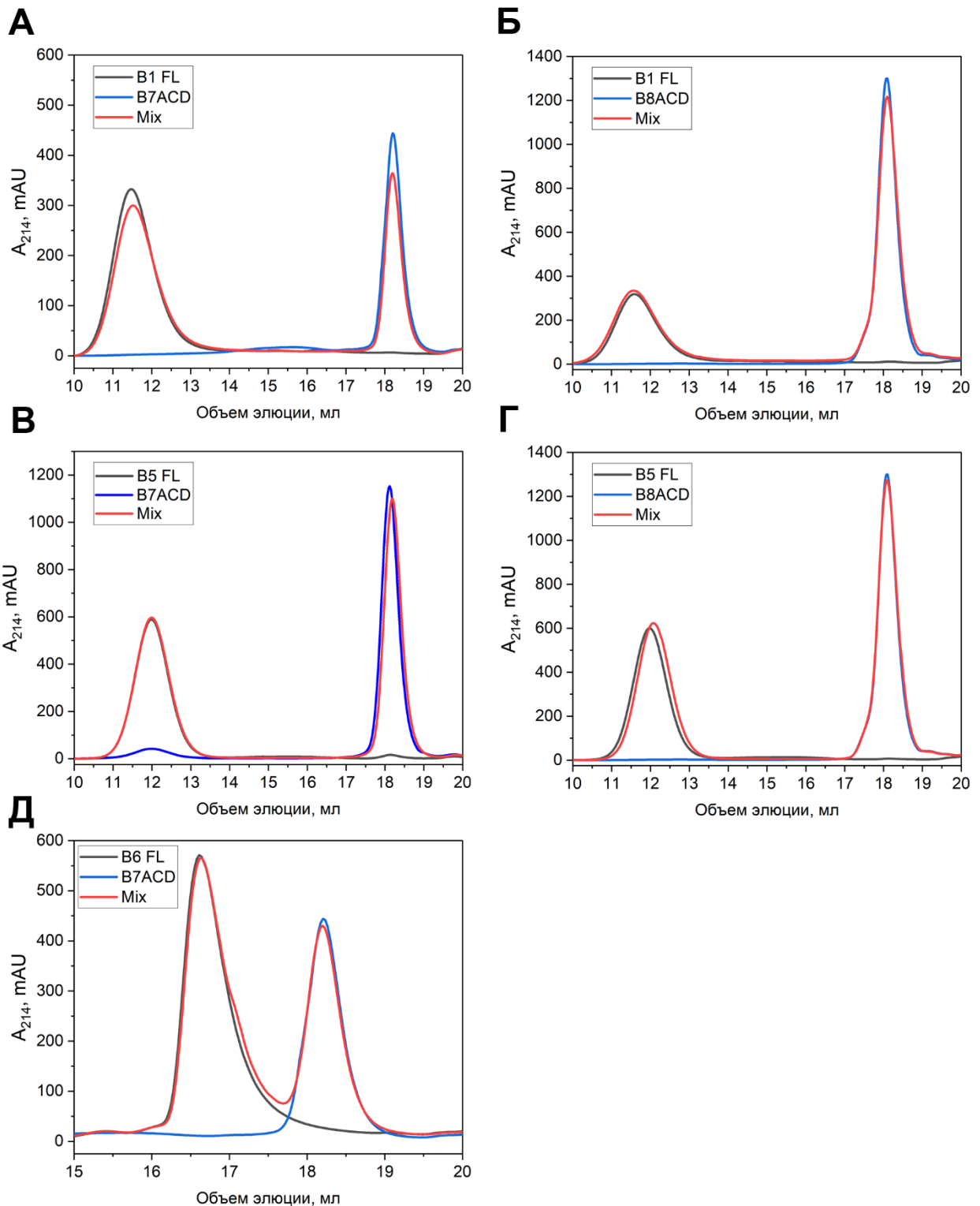
*** - Использование штаммов, содержащих PLysS плазмиду нежелательно, так как хроматографические и электрофоретические свойства хлорамфениколацетилтрансферазы и HspB8 практически идентичны

Приложение 3



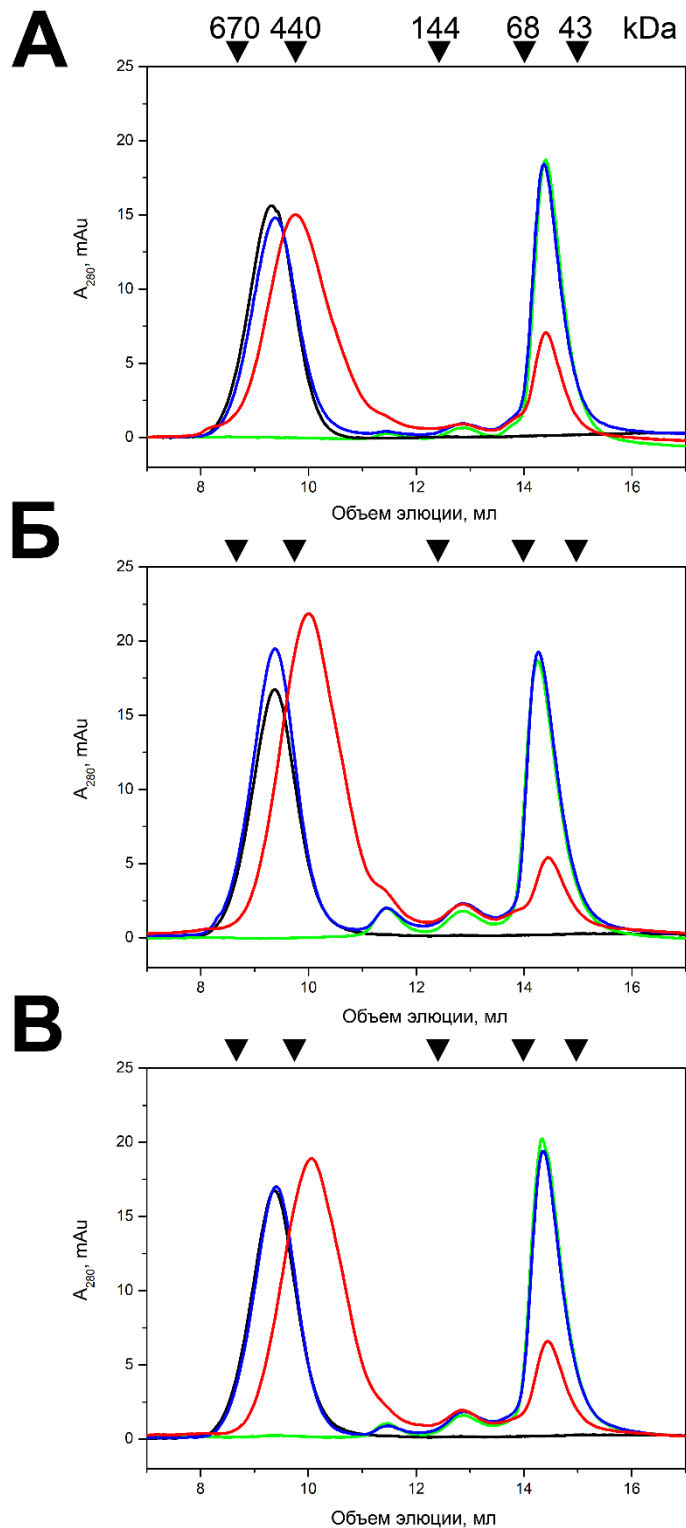
Анализ устойчивости канонических интерфейсов димеризации α -кристалиновых доменов при моделировании программой AlphaFold2 [158]. Для каждого ACD было сопоставлено пять моделей димеров. Для B1ACD, B5ACD и B6ACD Ca- RMSD не превышало 1 Å, что подтверждало устойчивость интерфейса димеризации. Для B8ACD при наложении пяти независимых моделей Ca- RMSD \gg 1 Å, что свидетельствует о вариабельности в структуре интерфейса димеризации. В случае B7ACD в результате моделирования было получено несколько вариантов димеров, содержащих как канонический интерфейс димеризации, соединенный короткими β -складками, так и нестандартный β 4/ β 8 интерфейс, нехарактерный для ACD. Каждая из структур для каждого из димеров ACD представлена в виде окрашенной ленточной модели. Прерывистая линия обозначает положение интерфейса димеризации. Ca- RMSD – корень среднего квадратичного отклонения положения α -атомов углерода полипептидной цепи при наложении и выравнивании нескольких моделей белков друг на друга.

Приложение 4



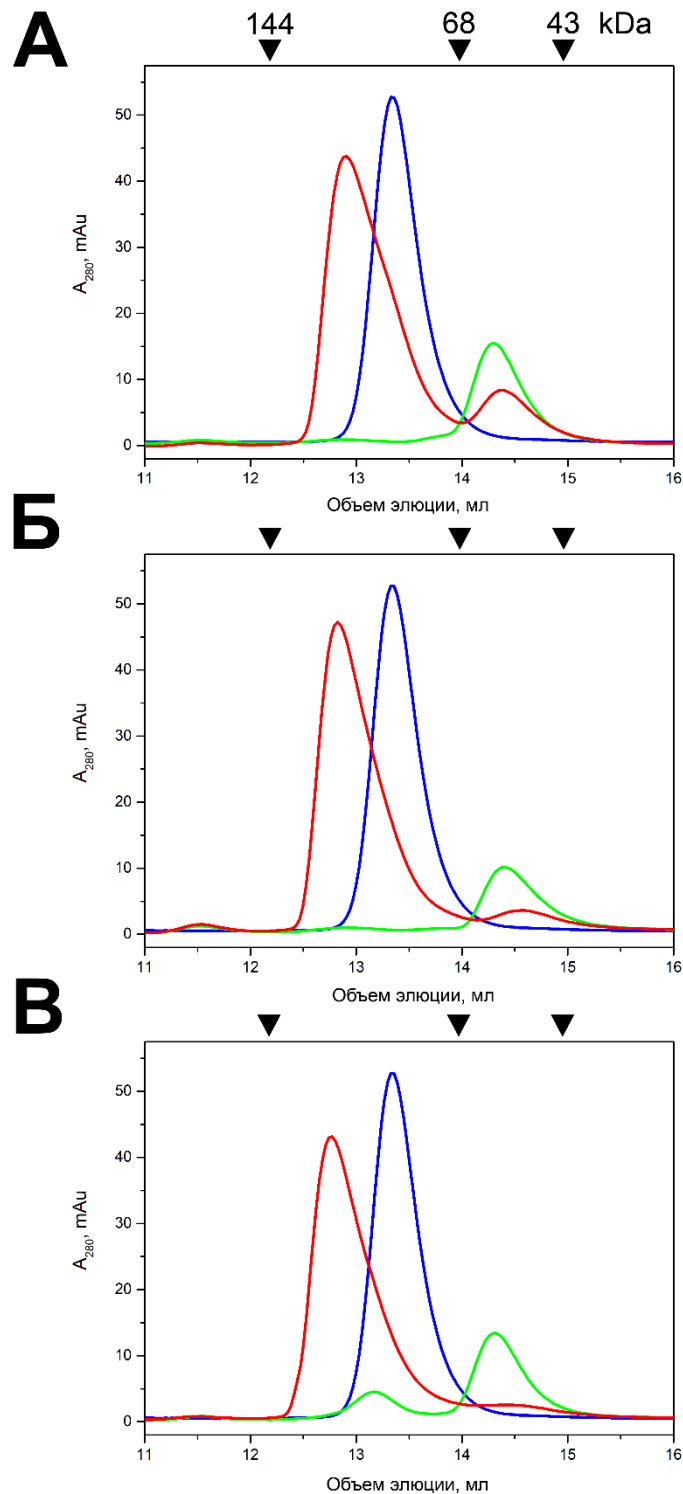
Исследование взаимодействия полноразмерных sHsp (HspB1, HspB5 и HspB6) с α -кристалиновыми доменами B7ACD, B8ACD. На отдельных панелях показаны результаты, полученные при анализе смесей HspB1 (B1 FL)/B7ACD (А), HspB1 (B1 FL)/B8ACD (Б), HspB5 (B5 FL)/B7ACD (В), HspB5 (B5 FL)/B8ACD (Г), HspB6 (B6 FL)/B7ACD (Д). Профили элюции полноразмерных белков обозначены черной линией, профили элюции ACD - синей линией, профили элюции эквимольных смесей, инкубированных при 42°C – красной линией.

Приложение 5



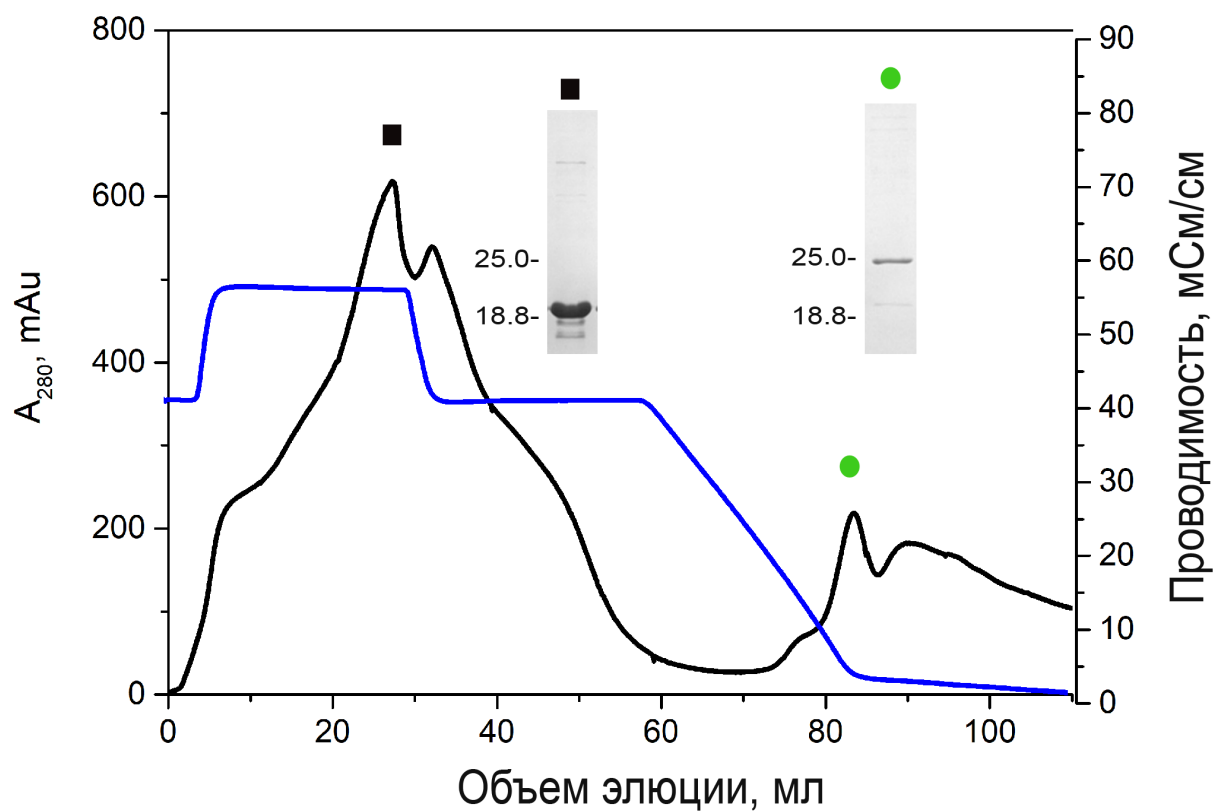
Взаимодействие HspB6 дикого типа (**А**) и его точечных мутантных форм S10F (**Б**) и P20L (**В**) с HspB5. На панелях представлена аналитическая гель-фильтрация изолированного HspB5 (черная линия), изолированного HspB6 (зеленая линия) или их эквимольной смеси, преинкубированной при 4 °С (синяя линия) или 42 °С (красная линия). Молекулярные массы белков стандартов указаны над стрелками.

Приложение 6



Взаимодействие HspB6 дикого типа (**А**) и его точечных мутантных форм S10F (**Б**) и P20L (**В**) с белком-партнером 14-3-3. На панелях представлена аналитическая гель-фильтрация изолированного 14-3-3 (синяя линия), изолированного HspB6 (зеленая линия) или их эквимольной смеси (красная линия). Молекулярные массы белков стандартов указаны над стрелками. При фосфорилировании препарата HspB6 дикого типа эффективность включения фосфата в состав белка составила около 80-90%, поэтому при проведении гель-фильтрации часть HspB6 дикого типа не включалась в состав комплекса с 14-3-3.

Приложение 7



Профиль элюции лизата клеток в ходе очистки препарата HspB7 Δ Ser на колонке HiTrap Phenyl. Поглощение при 280 нм соответствует черной линии, проводимость представлена синей линией. Фракции, отмеченные цветными фигурами, были проанализированы методом SDS-электрофореза, результаты которого представлены во вставках.