

ПОПЫТКА ОПТИМИЗИРОВАТЬ СВОЙСТВА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ХИМЕР МАЛОГО БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА HspB1 ПУТЕМ ИЗМЕНЕНИЯ ДЛИНЫ И ПРИРОДЫ ЛИНКЕРА*

© 2015 П.Н. Дацкевич, Л.К. Муранова, Н.Б. Гусев**

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва; факс: +7(495)939-2747,
электронная почта: NBGusev@mail.ru

Поступила в редакцию 02.10.14

После доработки 14.10.14

Получены и охарактеризованы химерные белки, состоящие из желтого флуоресцентного белка (enhanced yellow fluorescent protein, EYFP), соединенного линкерами различной длины и природы с *N*-концом малого белка теплового шока человека HspB1. В качестве линкеров, соединяющих два белка, были использованы 12-членные высокоподвижный глицин-сериновый линкер (L1), жесткий α -спиральный линкер (L2) и жесткий аланин-пролиновый линкер (L3). Помимо этого были получены химеры с высокоподвижным глицин-сериновым линкером длиной 12, 18 и 21 а.о. В отличие от белка дикого типа, образующего стабильные крупные олигомеры, содержащие в своем составе более 20 субъединиц, все флуоресцентные химеры вне зависимости от длины или природы линкера образуют только сравнительно мелкие (5–9 субъединиц) мало-стабильные олигомеры, склонные к диссоциации при низкой концентрации белка. При использовании лизоцима в качестве модельного субстрата шапероноподобная активность всех флуоресцентных химер была больше аналогичной активности белка дикого типа, при этом активность химер с линкерами типа L1 и L3 в меньшей степени отличалась от соответствующей активности белка дикого типа по сравнению с химерой, содержащей жесткий α -спиральный линкер типа L2. По мере увеличения длины линкера L1 от 12 до 21 а.о. происходило уменьшение различий в шапероноподобной активности флуоресцентных химер и белка дикого типа. Поэтому для получения флуоресцентных химер с шапероноподобной активностью, сопоставимой с аналогичной активностью белка дикого типа, желательно использовать достаточно длинные высокоподвижные линкеры. В связи с тем, что *N*-концевой домен малых белков теплового шока участвует в формировании олигомеров, любые способы прикрепления флуоресцентного белка к *N*-концу HspB1 приводят к драматическим изменениям его олигомерного состояния.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: малые белки теплового шока, HspB1, флуоресцентные химерные белки, четвертичная структура, шапероноподобная активность.

Малые белки теплового шока (sHsp или HspB) относятся к широко распространенному семейству белков, представители которого участвуют в поддержании белкового гомеостаза, а также в регуляции ключевых процессов жизнедеятельности клетки [1]. sHsp влияют на синтез [2] и деградацию белков [3], регулируют процессы апоптоза [4] и пролиферации [5], динамику цитоскелета [5–7] и др. В связи с тем, что sHsp участвуют в регуляции многочисленных процессов, нарушение уровня экспрессии или мутации в генах, кодирующих sHsp, коррелиру-

ет с развитием онкологических и нейродегенеративных заболеваний, различных видов катаракты и миопатий [8].

Характерной чертой всех sHsp является наличие консервативного α -кристаллинового домена, имеющего структуру двойного β -складчатого листа [9]. Этот домен фланкирован менее консервативными и менее упорядоченными *N*- и *C*-концевыми доменами, регулирующими олигомерное состояние и функциональную активность sHsp [10, 11]. В геноме человека обнаружено десять генов, кодирующих десять белков семейства sHsp, различающихся по свойствам и тканевому распределению [12], среди которых HspB1 и HspB5 наиболее подробно изучены и обладают самым широким спектром действия.

В связи с тем, что sHsp участвуют в многочисленных процессах и поэтому могут быть связаны с возникновением различных заболеваний

Принятые сокращения: sHsp – малые белки теплового шока, а.о. – аминокислотные остатки.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM14-244, 28.12.2014.

** Адресат для корреспонденции.

человека, в настоящее время наблюдается повышенный интерес к этой группе белков [13, 14]. Для детального понимания механизма функционирования sHsp необходимо подробное исследование их структуры и свойств. Флуоресцентные химеры, получаемые путем слияния разноцветных флуоресцентных белков и sHsp, открывают широкие возможности для исследований, проводимых в живой клетке, и могут использоваться для изучения внутриклеточной локализации и белок-белковых взаимодействий. Химерные белки, состоящие из sHsp человека и производных зеленого флуоресцентного белка, довольно давно применяются для изучения свойств sHsp [15–19]. Большинство указанных исследований проводилось на клеточном уровне без анализа физико-химических свойств полученных химер. При этом стоит заметить, что молекулярная масса флуоресцентных белков сопоставима с молекулярной массой sHsp или даже превышает ее. Кроме того, прикрепление флуоресцентных белков как к *N*-, так и к *C*-концу sHsp, играющих важную роль в функционировании и олигомеризации sHsp [11, 20], может сопровождаться значительным изменением их свойств.

Исследования, проведенные в нашей лаборатории [21–23], показали, что ранее описанные флуоресцентные химеры существенно отличаются от белков дикого типа по размеру формируемых ими олигомеров, шапероноподобной активности и способности образовывать гетероолигомерные комплексы с другими sHsp. Наибольшие различия в свойствах флуоресцентных химер и белков дикого типа были выявлены в случае двух sHsp, HspB1 и HspB5, склонных образовывать крупные олигомеры. Все это делает затруднительным использование описанных ранее флуоресцентных химер для анализа структуры и свойств sHsp. В то же время, как уже отмечалось, использование флуоресцентных химер открывает широкие возможности для исследования разных белков, и это делает очень желательным получение флуоресцентных химер sHsp со свойствами, мало отличающимися от свойств белков дикого типа. Хорошо известно, что свойства флуоресцентных химер зависят от длины и природы последовательностей (линкеров), соединяющих два белка в составе химерной конструкции [24, 25]. Для того чтобы получить химеру, свойства которой в наименьшей степени отличались бы от свойств белка дикого типа, мы попытались в данной работе создать флуоресцентные химеры, несущие флуоресцентный белок на *N*-конце HspB1 и соединенные с ним линкерами разной длины и разной струк-

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение молекулярно-генетических конструкций. Для получения кДНК химер с 12-членными линкерами методом ПЦР амплифицировали фрагменты кДНК, кодирующие HspB1 человека и желтый флуоресцентный белок (EYFP). При этом используемые праймеры содержали участки будущей линкерной последовательности и участок узнавания определенной рестриктазы. Фрагменты обрабатывали рестриктазами и лигировали, после чего клонировали в вектор pET23b(+) по участкам *NdeI* и *XhoI*. Последовательности линкеров, использованные рестриктазы и праймеры представлены в табл. 1.

кДНК химер с линкером типа L1 (подвижный неупорядоченный линкер) различной длины получали методом Overlap Extension PCR. Для этого использовали праймеры, содержащие перекрывающиеся участки будущего линкера. С помощью таких праймеров амплифицировали кДНК HspB1 и EYFP, содержащие перекрывающиеся фрагменты линкерной последовательности. Затем, используя кДНК частей химеры и «внешние» праймеры, методом ПЦР получали полноразмерную кДНК химерного белка. Полноразмерную вставку клонировали в вектор pET23b(+) по участкам *NdeI* и *XhoI*. Последовательности линкеров и использованные праймеры представлены в табл. 2.

Все полученные конструкции проверяли секвенированием.

Экспрессия и выделение химерных белков. Условия экспрессии и выделения химерных белков подбирали, основываясь на разработанной ранее методике [21]. Клетки *E. coli* штамма BL21 (DE3) трансформировали полученными плазмидами. Для приготовления ночной культуры одну колонию с чашки Петри инокулировали в 40 мл среды Луриа–Бертани (LB), содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и выращивали при 37°. Ночную культуру переносили в 800 мл трехкратной среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина (по 400 мл в двух колбах емкостью 2 л), инкубировали 7 ч при 37°, затем 16 ч при 30°. Клетки осаждали центрифугированием (10 мин, 5000 g) и суспендировали в 40 мл лизис-буфера (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 0,5 mM фенилметилсульфонилфторид (PMSF), 14 mM β-меркаптоэтанол). Суспензию замораживали до последующего выделения белков.

В ходе выделения белков клетки бактерий обрабатывали лизоцимом (конечная концентрация 0,05 мг/мл, 30 мин), ДНКазой I (конечная концентрация 2,5 мкг/мл, 30 мин, в присутствии 1,75 mM MgCl₂) и проводили двукратную обработку ультразвуком на дезинтеграторе Branson S250D (США)

(4 раза по 40 с, 40% мощности). Осадок отделяли центрифугированием, полученный супернатант фракционировали сульфатом аммония в интервале насыщения 0–40%. Осадок после центрифугирования (20 мин, 23 700 g) суспендировали в буфере Б (20 мМ Tris-Ас, рН 7,6, 10 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 14 мМ β-меркаптоэтанол, 0,1 мМ PMSF), диализовали в течение ночи против 2 л буфера Б, центрифугировали (30 мин, 105 000 g) и наносили на анионообменную колонку HiTrapQ 5 мл («Amersham Pharmacia Biotech», Великобритания). После промывки колонки химерные белки элюировали линейным градиентом NaCl (10–500 мМ).

Дальнейшую очистку полученных образцов проводили методом гель-фильтрации на колонке Superdex 200 HiLoad 26/60 («Amersham Pharmacia Biotech», Великобритания), уравновешенной буфером Б, содержащим 150 мМ NaCl. Фракции, обогащенные целевым белком, объединяли, концентрировали с помощью ультрафильтрации и диализовали в течение ночи против 2 л буфера Б, содержавшего 2 мМ дитиотреитол (ДТТ) вместо β-меркаптоэтанола. Полученный образец разделяли на аликвоты и замораживали.

Исследование олигомерного состояния химерных белков. Четвертичную структуру флуоресцент-

Таблица 1. Праймеры, использованные для получения химер HspB1 с разными типами линкера

| EYFP-L1-HspB1: линкер L1: GSAGSAATGGSA, рестриктаза <i>AgeI</i> | |
|--|--|
| HspB1_L1_fw | 5'-ТТАТ <u>АССGGT</u> GGCAGCGCAATGACCGAGCGCCGC-3' |
| FP_L1_rev | 5'-ТТАТ <u>АССGGT</u> AGCAGCGGAGCCGGCGGAGCCCTTGTACAGCTCGTC-3' |
| EYFP-L2-HspB1: линкер L2: AEAAAKEAAAKA, рестриктаза <i>NotI</i> | |
| HspB1_L2_fw | 5'-ТТАТ <u>GCGGCCG</u> CTAAAGCGATGACCGAGCGCCGCGTC-3' |
| FP_L2_rev | 5'-ТТАТ <u>GCGGCCG</u> CCCTCCTTAGCTGCAGCTTCAGCCTTGTACAGCTCGTC-3' |
| EYFP-L3-HspB1: линкер L3: APAPAPGPAPAP, рестриктаза <i>XmaI</i> | |
| HspB1_L3_fw | 5'-ТТАТ <u>ССCGGGT</u> TCCAGCTCCTGCACCTATGACCGAGCGCCGC-3' |
| FP_L3_rev | 5'-ТТАТ <u>ССCGGGG</u> CAGGTGCTGCTGCTTGTACAGCTCGTCCCATG-3' |
| T7-forward | 5'-TACGACTCACTATAGGGAGACC-3' |
| T7-reverse | 5'-ATGCTAGTTATTGCTCAGCGGTG-3' |

Примечание. Подчеркнуты участки узнавания соответствующими рестриктазами. В качестве прямого праймера для EYFP и обратного для HspB1 использовали T7-forward primer и T7-reverse primer соответственно. Линкер L1 – высокоподвижный, «мягкий»; линкер L2 – «жесткий», образующий α-спираль; L3 – жесткий, аланин-пролиновый линкер [24].

Таблица 2. Праймеры, использованные для получения химер HspB1 с линкером L1 различной длины

| EYFP-15L1-HspB1: линкер L1, 15 а.о.: GSAGSAATGGSAGSA | |
|---|--|
| HspB1_fw_15L1 | 5'-GGCAGCGCAGGTTCTGCAATGACCGAGCGCC-3' |
| 15L1_rev | 5'-TGCAGAACCTGCGTGCCACCG-3' |
| EYFP-18L1-HspB1: линкер L1, 18 а.о.: GSAGSAATGGSAGSAGSA | |
| HspB1_fw_18L1 | 5'-GGTTCTGCAGGCTCCGCCATGACCGAGCGCC-3' |
| 18L1_rev | 5'-GGCGGAGCCTGCAGAACCTGCGTGCCACCG-3' |
| EYFP-21L1-HspB1: линкер L1, 21 а.о.: GSAGSAATGGSAGSAGSAGSA | |
| HspB1_fw_21L1 | 5'-GGCTCCGCCGGCAGCGCAATGACCGAGCGCC-3' |
| 21L1_rev | 5'-TGCGTGCCGGCGGAGCCTGCAGAACCTGCGTGCCACCG-3' |

Примечание. При получении фрагментов кДНК химер с перекрывающимися участками использовали «_rev» праймеры – обратные праймеры к EYFP, «_fw_» праймеры – прямые праймеры к HspB1. В качестве внешних праймеров использовали T7 праймеры.

ных химер анализировали методом гель-фильтрации на колонке Superdex 200 HR 10/30 («Amersham Pharmacia Biotech», Великобритания). На колонку, уравновешенную буфером Б, содержащим 14 мМ β-меркаптоэтанол и 150 мМ NaCl, наносили пробы объемом 150 мкл, содержавшие 10–280 мкг белка. Образцы элюировали тем же буфером со скоростью 0,5 мл/мин, собирая фракции по 400 мкл. Колонку калибровали белками-стандартами с кажущимися молекулярными массами, указанными в скобках: тироглобулин (670 кДа), ферритин (440 кДа), БСА (68 кДа), овальбумин (42 кДа) и химотрипсиноген (25 кДа).

Исследование шапероноподобной активности химерных белков. Шапероноподобную активность химерных белков определяли по их способности препятствовать агрегации модельного белка-субстрата лизоцима. Все измерения проводили в буфере для агрегации (50 мМ KH_2PO_4 , 50 мМ NaCl, pH 7,4) при 37°. Пробы с конечным объемом 300 мкл содержали 10 мкМ лизоцима и 2–5 мкМ исследуемых белков. Агрегацию лизоцима инициировали добавлением ДТТ до конечной концентрации 20 мМ. Процесс агрегации отслеживали по увеличению оптической плотности при 360 нм. Каждый эксперимент повторяли не менее 2 раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как уже отмечалось, для получения флуоресцентных химер, в наименьшей степени отличающихся от белка дикого типа, мы использовали два подхода. Сначала нами были получены химеры, в которых желтый флуоресцентный белок был прикреплен к N-концу HspV1 тремя разными по природе, но одинаковыми по длине линкерами. Во всех случаях мы использовали 12-членный линкер, при этом линкер первого типа (L1) имел состав GSAGSAATGGSА и обладал высокой гибкостью и подвижностью (так называемый «мягкий линкер»), линкер второго типа (L2) имел состав AEAAAKEAAKA и был склонен к образованию жесткой α-спирали, и, наконец, линкер третьего типа (L3) имел состав APAPGAPAP и был склонен к образованию жесткой изломанной структуры. Во второй серии экспериментов мы получали флуоресцентные химеры, в которых желтый флуоресцентный белок был прикреплен к N-концу HspV1 одинаковым по природе, но разным по длине (12–15–18–21 а.о.) гибким линкером: 12L1 (GSAGSAATGGSА), 15L1 (GSAGSAATGGSAGSA), 18L1 (GSAGSAATGGSAGSAGSA), 21L1 (GSAGSAATGGSAGSAGSAGSA).

Для исследования четвертичной структуры полученных флуоресцентных химер мы использовали метод гель-фильтрации, при этом на колонку наносили разное количество HspV1 дикого типа и флуоресцентных химер так, чтобы конечная молярная концентрация белка дикого типа и его флуоресцентных химер была бы одинаковой. Учитывая тот факт, что молекулярная масса химер примерно в 2 раза больше молекулярной массы белка дикого типа, мы наносили на колонку 10–130 мкг белка дикого типа и 10–300 мкг флуоресцентных химер (рис. 1 и 2). Оказалось, что в выбранных условиях HspV1 образует крупные олигомеры с кажущейся молекулярной массой 520–535 кДа, что хорошо согласуется с ранее полученными данными [21–23]. Олигомерное состояние HspV1 дикого типа не зависит от концентрации белка в наносимой на колонку пробе. Учитывая, что молекулярная масса мономера HspV1 дикого типа составляет ~23 кДа, можно предположить, что в состав крупных олигомеров этого белка входит 22 или 23 субъединицы.

Олигомерное состояние флуоресцентных химер с линкерами различной природы существенно зависит от концентрации белка, наносимого на колонку (рис. 1). При нанесении на колонку малых количеств белка объем элюции флуоресцентных химер составлял 11,8–12,1 мл, что соответствует кажущейся молекулярной массе 270–300 кДа. Учитывая молекулярную массу мономера флуоресцентных химер, состав-

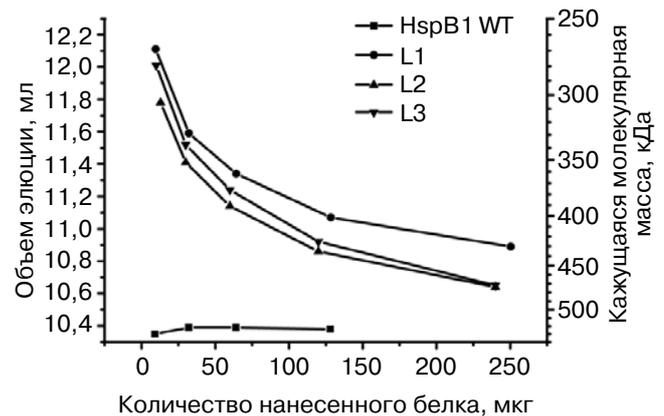


Рис. 1. Олигомерное состояние HspV1 дикого типа и флуоресцентных химер с различными типами линкера. Зависимость объема элюции от количества белка, нанесенного на колонку Superdex 200. На колонку наносили HspV1 дикого типа (HspV1 WT) и его флуоресцентные химеры с 12-членным линкером, обладающим высокой гибкостью и подвижностью (L1), линкером, склонным образовывать α-спираль (L2), или аланин-пролиновым линкером (L3)

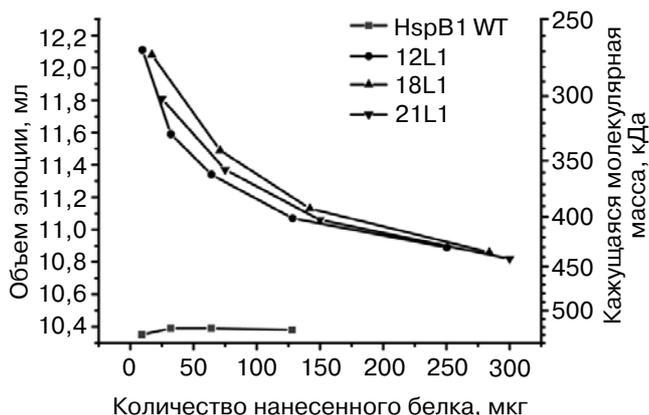


Рис. 2. Олигомерное состояние HspB1 дикого типа и его флуоресцентных химер с гибкими подвижными линкерами типа L1 разной длины. Зависимость объема элюции от количества белка, нанесенного на колонку Superdex 200. На колонку наносили HspB1 дикого типа (HspB1 WT), а также флуоресцентные химеры с 12-членным (12L1), 18-членным (18L1) или 21-членным (21L1) линкерами

ляющую ~50 кДа, можно предположить, что при низкой концентрации все анализируемые химеры образуют малые олигомеры, в состав которых входит 5 или 6 мономеров белка. При увеличении количества белка, наносимого на колонку, объем элюции исследуемых химер уменьшается до 10,7–10,9 мл, что соответствует кажущейся молекулярной массе 430–470 кДа. Таким образом, даже при нанесении на колонку больших количеств исследуемых белков олигомеры флуоресцентных химер содержат в своем составе около 9 субъединиц, что примерно в 2 раза меньше, чем количество субъединиц, входящих в состав олигомеров, образованных белком дикого типа.

Следует отметить, что изменение природы линкера и переход от 12-членного мягкого подвижного линкера к 12-членному спиральному или 12-членному аланин-пролиновому линкеру не приводит к существенным изменениям в зависимости олигомерного состояния флуоресцентных химер от концентрации белка (рис. 1). Более того, увеличение длины мягкого линкера с 12 до 21 а.о. также не сопровождается сколько-нибудь заметными изменениями в олигомерном состоянии флуоресцентной химеры (рис. 2). Вне зависимости от природы или длины линкера флуоресцентные химеры образуют неустойчивые олигомеры, содержащие в своем составе меньшее количество субъединиц, чем олигомеры белка дикого типа.

Шапероноподобная активность является одним из наиболее важных свойств sHsp. По этой

причине представлялось целесообразным сравнить шапероноподобную активность HspB1 дикого типа и его флуоресцентных химер. Мы использовали лизоцим в качестве модельного белка для измерения шапероноподобной активности. Восстановление дисульфидных мостиков приводит к денатурации и агрегации лизоцима, которая сопровождается увеличением оптической плотности при 340 нм (рис. 3, кривая 0). В выбранных условиях HspB1 дикого типа замедляет процесс агрегации восстановленного лизоцима, однако не способен полностью предотвратить агрегацию этого модельного белка (рис. 3, а, кривая 1). Флуоресцентная химера с подвижным 12-членным линкером (L1) в свою очередь обладала несколько большей шапероноподобной активностью (рис. 3, а, кривая 2).

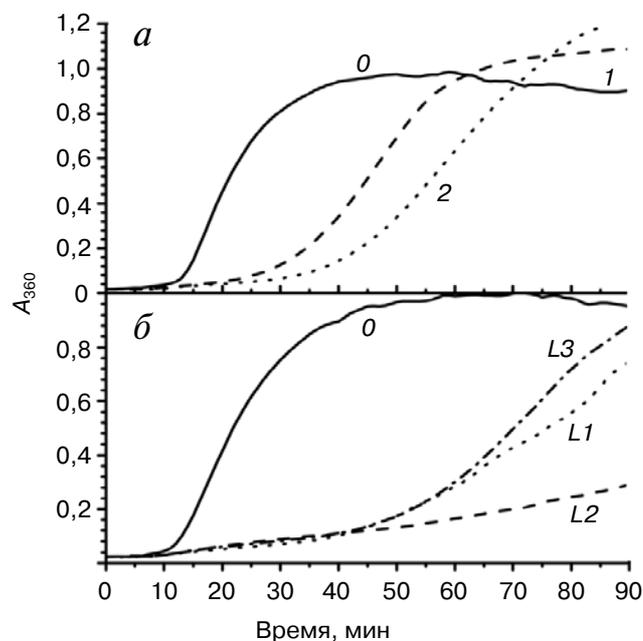


Рис. 3. Шапероноподобная активность HspB1 дикого типа и его флуоресцентных химер с линкерами различной природы. а – Сравнение шапероноподобной активности HspB1 дикого типа и его флуоресцентных химер с использованием лизоцима в качестве модельного субстрата. Представлено изменение оптической плотности в пробах, содержащих: 0 – изолированный лизоцим (10 µM), 1 – лизоцим в присутствии HspB1 дикого типа (5 µM) или 2 – лизоцим в присутствии флуоресцентной химеры с 12-членным гибким и подвижным линкером L1 (5 µM); б – шапероноподобная активность химер с различным типом 12-членного линкера. Изменение оптической плотности в пробе, содержащей изолированный лизоцим (10 µM) (0) или лизоцим в присутствии 5 µM флуоресцентных химер с линкером, обладающим высокой гибкостью и подвижностью (L1), линкером, склонным образовывать α-спираль (L2), или аланин-пролиновым линкером (L3)

Мы проанализировали влияние природы линкера на шапероноподобную активность HspB1 (рис. 3, б). Оказалось, что все исследуемые химеры обладали более высокой шапероноподобной активностью, чем белок дикого типа. При этом шапероноподобные активности химер с подвижным мягким линкером (L1) и аланин-пролиновым линкером (L3) были сопоставимы между собой и, хотя и были больше шапероноподобной активности белка дикого типа, тем не менее в наименьшей степени отличались от свойств немодифицированного белка дикого типа. В то же время шапероноподобная активность флуоресцентной химеры с линкером, склонным образовывать α -спираль (L2), была наибольшей и существенно отличалась от шапероноподобной активности белка дикого типа (рис. 3, б).

В отдельной серии экспериментов мы анализировали, каким образом длина линкера влияет на шапероноподобную активность флуоресцентных химер HspB1. Как уже отмечалось, шапероноподобная активность флуоресцентных химер с гибким, подвижным линкером в наибольшей степени сходна с аналогичной активностью белка дикого типа. Поэтому мы использовали гибкий подвижный линкер типа L1 и варьировали его длину от 12 до 21 а.о. (рис. 4). Все анализируемые химеры обладали большей шапероноподобной активностью, чем белок дикого типа (рис. 4). В то же время увеличение длины линкера приводило к уменьшению шапероноподобной активности флуоресцентных химер, и химера с наиболее длинным 21-членным линкером обладала шапероноподобной активностью, в наибольшей степени похожей на активность белка дикого типа.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Создание флуоресцентных химер представляется важным и интересным направлением исследования различных белков, в том числе sHsp. Однако в последнем случае создание флуоресцентных химер осложняется тем, что размеры флуоресцентного белка оказываются сопоставимыми с размером sHsp. Еще большие сложности возникают в связи с тем, что sHsp склонны к образованию различных гомо- и гетероолигомеров [1, 26], и при этом как *N*-, так и *C*-концы sHsp участвуют в формировании олигомеров [20, 27]. Поэтому *a priori* присоединение флуоресцентного белка как к *N*-, так и к *C*-концу sHsp неминуемо повлечет за собой изменение упаковки субъединиц в составе гомо- или гетероолигомеров.

Для того чтобы обойти указанные сложности и получить флуоресцентные химеры, свойства которых в наименьшей степени отличались бы от свойств белка дикого типа, мы попытались варьировать длину и природу линкера, обеспечивающего прикрепление флуоресцентного белка к *N*-концу HspB1.

Оказалось, что ни изменение длины линкера, ни изменение его свойств (использование гибких неструктурированных линкеров или линкеров, образующих α -спираль или жесткую изломанную структуру) не приводит к получению флуоресцентных химер, олигомерное состояние которых похоже на олигомерное состояние белка дикого типа. Практически во всех исследованных случаях полученные флуоресцентные химеры образовывали нестабильные олигомеры, в состав которых по нашим расчетам входит 5–9 мономеров, что примерно в 2 раза меньше, чем количество субъединиц, входящих в состав олигомеров белка дикого типа (рис. 1 и 2). Как уже отмечалось, олигомеры, образованные флуоресцентными химерами, были достаточно нестабильными, и при разведении происходила диссоциация, в ходе которой накапливались олигомеры меньшего размера. В этом отношении флуоресцентные химеры существенно отличаются от белка дикого типа, олигомеры которого обладают высокой стабильностью и не диссоциируют при разведении. По всей видимости, такое поведение флуоресцентных химер обусловлено тем, что прикрепление массивного флуоресцентного белка к *N*-концу HspB1 делает невозможным сборку стабильных олигомеров, в формировании которых напрямую участвует

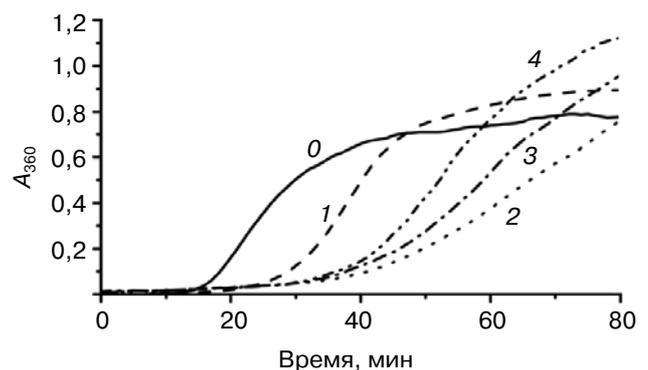


Рис. 4. Шапероноподобная активность флуоресцентных химер с гибкими подвижными линкерами типа L1 длиной 12, 18 и 21 а.о. Изменение оптической плотности в пробе, содержащей изолированный лизоцим (10 μ M) (0), лизоцим в присутствии 5 μ M HspB1 дикого типа (1) или флуоресцентные химеры с 12-членным (2), 18-членным (3) или 21-членным (4) линкером

подвижная *N*-концевая последовательность, как показано для α B-кристаллина [28] и, вероятно, характерно для других sHsp. Следствием всех этих процессов является то, что при одинаковой молярной концентрации флуоресцентные химеры будут образовывать большее количество малых олигомеров, чем белок дикого типа, который при той же молярной концентрации сможет образовать только ограниченное количество крупных олигомеров. Согласно одной из гипотез, сформулированных в литературе [29, 30], крупные олигомеры sHsp не очень эффективны в связывании денатурированных белков, и для проявления полной шапероноподобной активности крупные олигомеры должны сначала диссоциировать и связать денатурированные белки, после чего становится возможной обратная сборка крупных олигомеров. Если это предположение справедливо, то можно ожидать, что флуоресцентные химеры, склонные к диссоциации, будут обладать большей шапероноподобной активностью, чем белок дикого типа.

Действительно, оказалось, что при использовании лизоцима в качестве модельного субстрата шапероноподобная активность практически всех исследованных флуоресцентных химер была больше аналогичной активности белка дикого типа (рис. 3 и 4). При этом оказалось, что химеры с гибким линкером и аланин-пролиновым линкером обладают сопоставимой шапероноподобной активностью, а химера с жестким α -спиральным линкером обладает значительно повышенной шапероноподобной активностью (рис. 3, б, кривая L2). При этом все указанные химеры обладали сходной олигомерной структурой (рис. 1). Известно, что некоторые участки связывания белков-субстратов располагаются в *N*-концевом подвижном домене sHsp [31, 32]. По всей видимости, природа линкера влияет на ориентацию флуоресцентного белка относительно функционально важного

N-концевого домена HspB1, и именно поэтому в зависимости от жесткости или гибкости линкера флуоресцентные химеры могут обладать различной шапероноподобной активностью.

Это предположение хорошо согласуется с результатами, полученными на флуоресцентных химерах с различной длиной подвижного гибкого линкера. Действительно, оказалось, что увеличение длины линкера приводит к тому, что шапероноподобная активность химер становится близкой к аналогичной активности белка дикого типа (рис. 4). Вероятно, в этом случае удаление флуоресцентного белка от определенных участков в *N*-концевой области малого белка дикого типа нивелирует влияние флуоресцентного белка на взаимодействие sHsp с белком-мишенью.

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что получение флуоресцентных химер, пригодных для исследования малых по размеру белков, склонных к образованию олигомеров, является принципиально сложной задачей. По всей видимости, получение флуоресцентных химер HspB1 с олигомерной структурой, идентичной структуре белка дикого типа, практически невозможно, потому что как *N*-, так и *C*-концевые участки sHsp участвуют в формировании олигомеров. В то же время можно попытаться получить флуоресцентные химеры, шапероноподобные свойства которых были бы сопоставимы со свойствами белка дикого типа. Для этого следует использовать как можно более длинные гибкие и достаточно подвижные линкеры. В любом случае для получения флуоресцентных химер, пригодных для использования в клеточных исследованиях, потребуется большая дополнительная исследовательская работа.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-35-00026).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mymrikov, E.V., Seit-Nebi, A.S., and Gusev, N.B. (2011) Large potentials of small heat shock proteins, *Physiol. Rev.*, **91**, 1123–1159.
2. Carra, S., Rusmini, P., Crippa, V., Giorgetti, E., Boncoraglio, A., Cristofani, R., Naujock, M., Meister, M., Minoia, M., Kampinga, H.H., and Poletti, A. (2013) Different anti-aggregation and pro-degradative functions of the members of the mammalian sHSP family in neurological disorders, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **368**.
3. Boelens, W.C., Croes, Y., and de Jong, W.W. (2001) Interaction between alphaB-crystallin and the human 20S proteasomal subunit C8/alpha7, *Biochim. Biophys. Acta*, **1544**, 311–319.
4. Paul, C., Simon, S., Gibert, B., Viot, S., Manero, F., and Arrigo, A.P. (2010) Dynamic processes that reflect anti-apoptotic strategies set up by HspB1 (Hsp27), *Exp. Cell Res.*, **316**, 1535–1552.
5. Crowe, J., Aubareda, A., McNamee, K., Przybycien, P.M., Lu, X., Williams, R.O., Bou-Gharios, G., Saklatvala, J., and Dean, J.L. (2013) Heat shock protein B1-deficient mice display impaired wound healing, *PLoS One*, **8**, e77383.
6. Wettstein, G., Bellaye, P.S., Micheau, O., and Bonniaud, P. (2012) Small heat shock proteins and the cytoskeleton: an essential interplay for cell integrity, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **44**, 1680–1686.

7. Seit-Nebi, A.S., Datskevich, P., and Gusev, N.B. (2013) Commentary on paper: Small heat shock proteins and the cytoskeleton: an essential interplay for cell integrity (Wettstein et al.), *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **45**, 344–346.
8. Datskevich, P.N., Nefedova, V.V., Sudnitsyna, M.V., and Gusev, N.B. (2012) Mutations of small heat shock proteins and human congenital diseases, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 1500–1514.
9. Bagneris, C., Bateman, O.A., Naylor, C.E., Cronin, N., Boelens, W.C., Keep, N.H., and Slingsby, C. (2009) Crystal structures of alpha-crystallin domain dimers of alphaB-crystallin and Hsp20, *J. Mol. Biol.*, **392**, 1242–1252.
10. Delbecq, S.P., and Klevit, R.E. (2013) One size does not fit all: the oligomeric states of alphaB crystallin, *FEBS Lett.*, **587**, 1073–1080.
11. Lejl-Garolla, B., and Mauk, A.G. (2012) Roles of the N- and C-terminal sequences in Hsp27 self-association and chaperone activity, *Protein Sci.*, **21**, 122–133.
12. Kappe, G., Franck, E., Verschuure, P., Boelens, W.C., Leunissen, J.A., and de Jong, W.W. (2003) The human genome encodes 10 alpha-crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10, *Cell Stress Chaperones*, **8**, 53–61.
13. Arrigo, A.P., and Gibert, B. (2012) HspB1 dynamic phospho-oligomeric structure dependent interactome as cancer therapeutic target, *Curr. Mol. Med.*, **12**, 1151–1163.
14. Cox, D., Carver, J.A., and Ecroyd, H. (2014) Preventing alpha-synuclein aggregation: The role of the small heat-shock molecular chaperone proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1842**, 1830–1843.
15. Sun, X., Fontaine, J.M., Rest, J.S., Sheldon, E.A., Welsh, M.J., and Benndorf, R. (2004) Interaction of human HSP22 (HSPB8) with other small heat shock proteins, *J. Biol. Chem.*, **279**, 2394–2402.
16. Fontaine, J.M., Sun, X., Benndorf, R., and Welsh, M.J. (2005) Interactions of HSP22 (HSPB8) with HSP20, alphaB-crystallin, and HSPB3, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **337**, 1006–1011.
17. Fontaine, J.M., Sun, X., Hoppe, A.D., Simon, S., Vicart, P., Welsh, M.J., and Benndorf, R. (2006) Abnormal small heat shock protein interactions involving neuropathy-associated HSP22 (HSPB8) mutants, *FASEB J.*, **20**, 2168–2170.
18. Borrelli, M.J., Bernock, L.J., Landry, J., Spitz, D.R., Weber, L.A., Hickey, E., Freeman, M.L., and Corry, P.M. (2002) Stress protection by a fluorescent Hsp27 chimera that is independent of nuclear translocation or multimeric dissociation, *Cell Stress Chaperones*, **7**, 281–296.
19. Eygrafov, O.V., Mersiyanova, I., Irobi, J., van den Bosch, L., Dierick, I., Leung, C.L., Schagina, O., Verpoorten, N., van Impe, K., Fedotov, V., Dadali, E., Auer-Grumbach, M., Windpassinger, C., Wagner, K., Mitrovic, Z., Hilton-Jones, D., Talbot, K., Martin, J.J., Vasserman, N., Tverskaya, S., Polyakov, A., Liem, R.K., Gettemans, J., Robberecht, W., de Jonghe, P., and Timmerman, V. (2004) Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy, *Nature Genet.*, **36**, 602–606.
20. Delbecq, S.P., Jehle, S., and Klevit, R. (2012) Binding determinants of the small heat shock protein, alphaB-crystallin: recognition of the 'IxI' motif, *EMBO J.*, **31**, 4587–4594.
21. Datskevich, P.N., Mymrikov, E.V., Sluchanko, N.N., Shemetov, A.A., Sudnitsyna, M.V., and Gusev, N.B. (2012) Expression, purification and some properties of fluorescent chimeras of human small heat shock proteins, *Protein Express. Purif.*, **82**, 45–54.
22. Datskevich, P.N., Mymrikov, E.V., and Gusev, N.B. (2012) Utilization of fluorescent chimeras for investigation of heterooligomeric complexes formed by human small heat shock proteins, *Biochimie*, **94**, 1794–1804.
23. Datskevich, P.N., and Gusev, N.B. (2014) Structure and properties of chimeric small heat shock proteins containing yellow fluorescent protein attached to their C-terminal ends, *Cell Stress Chaperones*, **19**, 507–518.
24. Chen, X., Zaro, J.L., and Shen, W.C. (2013) Fusion protein linkers: property, design and functionality, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**, 1357–1369.
25. Arai, R., Ueda, H., Kitayama, A., Kamiya, N., and Nagamune, T. (2001) Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein, *Protein Eng.*, **14**, 529–532.
26. Arrigo, A.P. (2013) Human small heat shock proteins: protein interactomes of homo- and hetero-oligomeric complexes: an update, *FEBS Lett.*, **587**, 1959–1969.
27. Shcherbo, D., Souslova, E.A., Goedhart, J., Chepurnykh, T.V., Gaintzeva, A., Shemiakina, I.I., Gadella, T.W., Lukyanov, S., and Chudakov, D.M. (2009) Practical and reliable FRET/FLIM pair of fluorescent proteins, *BMC Biotechnol.*, **9**, 24.
28. Jehle, S., Vollmar, B.S., Bardiaux, B., Dove, K.K., Rajagopal, P., Gonen, T., Oschkinat, H., and Klevit, R.E. (2011) N-terminal domain of alphaB-crystallin provides a conformational switch for multimerization and structural heterogeneity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 6409–6414.
29. Shashidharamurthy, R., Koteiche, H.A., Dong, J., and McHaourab, H.S. (2005) 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.*, **280**, 5281–5289.
30. Leder, L., Stark, W., Freuler, F., Marsh, M., Meyerhofer, M., Stettler, T., Mayr, L.M., Britanova, O.V., Strukova, L.A., Chudakov, D.M., and Souslova, E.A. (2010) The structure of Ca²⁺ sensor Case16 reveals the mechanism of reaction to low Ca²⁺ concentrations, *Sensors*, **10**, 8143–8160.
31. Ghosh, J.G., Estrada, M.R., and Clark, J.I. (2005) Interactive domains for chaperone activity in the small heat shock protein, human alphaB crystallin, *Biochemistry*, **44**, 14854–14869.
32. Jaya, N., Garcia, V., and Vierling, E. (2009) Substrate binding site flexibility of the small heat shock protein molecular chaperones, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 15604–15609.

**ATTEMPT TO OPTIMIZE SOME PROPERTIES
OF FLUORESCENT CHIMERAS OF HUMAN SMALL
HEAT SHOCK PROTEIN HspB1 BY MODIFYING
LINKER LENGTH AND NATURE**

P. N. Datskevich, L. K. Muranova, N. B. Gusev*

*M. V. Lomonosov Moscow State University, Department
of Biology, Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-2747,
E-mail: NBGusev@mail.ru*

Received September 2, 2014

Revision received September 12, 2014

Chimerical proteins consisting of enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) connected by linkers of different length and nature to the *N*-terminal end of small heat shock protein HspB1 were obtained and characterized. In order to obtain fluorescent chimeras with properties similar to those of unmodified small heat shock protein, we used either 12-residue long linkers of different nature (highly flexible Gly-Ser linker (L1), rigid α -helical linker (L2) or rigid Ala-Pro linker (L3), or highly flexible Gly-Ser linker consisting of 12, 18, or 21 residues. The wild-type HspB1 formed large stable oligomers consisting of more than 20 subunits. Independent of the length or the nature of the linker, all the fluorescent chimeras formed small (5–9 subunits) oligomers tending to dissociate at low protein concentration. Chaperone-like activity of the wild-type HspB1 and its fluorescent chimeras were compared by using lysozyme as a model protein substrate. Under the conditions used, all the fluorescent chimeras possessed higher chaperone-like activity than the wild-type HspB1. Chaperone-like activity of fluorescent chimeras with L1 and L3 linkers was less different from that of the wild-type HspB1 than the chaperone-like activity of chimeras with rigid L2 linker. Increase in the length of the L1 linker from 12 up to 21 residues leads to decrease in the difference in the chaperone-like activity between the wild-type protein and its fluorescent chimeras. Since the *N*-terminal domain of small heat shock proteins participates in formation of large oligomers, any way of attachment of the fluorescent protein to the *N*-terminal end of HspB1 leads to dramatic changes of its oligomeric structure. Long flexible linkers should be used to obtain fluorescent chimeras with chaperone-like properties similar to those of the wild-type HspB1.

Key words: sHsp, HspB1, fluorescent chimeras, quaternary structure, chaperone-like activity