

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 615.371.072.074

### ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДОМЕНОВ И МЕЖДОМЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКАХ HSP70 ЧЕЛОВЕКА

© 2011 г. В. А. Черников<sup>1\*</sup>, Н. В. Гороховец<sup>1,2</sup>, Л. В. Савватеева<sup>1,2</sup>, С. Е. Северин<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Московский научно-исследовательский институт медицинской экологии, Москва, 117149

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт молекулярной медицины Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Москва, 119991

Поступила в редакцию 06.09.2010 г.

Принята к печати 17.02.2011 г.

Исследованы особенности функционирования шаперонных белков теплового шока семейства HSP70 с использованием рекомбинантных белков человека: индуцибельного HSP70<sub>A1B</sub> и конститутивного HSC70, а также двух гибридных белков HSP70<sub>HYB</sub> и HSC70<sub>HYB</sub>, отличающихся составом АТФ- и пептид-связывающих доменов. Охарактеризована АТФазная и пептид-связывающая активность полученных белков. Конформационные модификации, связанные с заменой доменов, а также изменения, возникающие при взаимодействии белков с пептидами, изучали по спектрам в УФ-области. Показано определяющее влияние АТФазного домена на субстратную специфичность пептид-связывающего домена HSP70 и дополнены представления о механизме функционирования шаперонной системы. Показано, что пептид-связывающий домен влияет на АТФазную активность полученных рекомбинантных белков. Обнаружена линейная зависимость между АТФазной активностью и количеством пептидных комплексов в препаратах HSP70. Эта зависимость может быть использована для количественного определения комплексов HSP70 с немечеными пептидами.

**Ключевые слова:** белки теплового шока HSP70, междоменные взаимодействия, АТФазная активность, анализ УФ-спектров.

CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT HUMAN HSP70'S DOMAINS FUNCTIONS AND INTERDOMAIN INTERACTIONS, by V. A. Chernikov<sup>1</sup>, N. V. Gorokhovets<sup>1,2</sup>, L. V. Savvateeva<sup>1,2</sup>, S. E. Severin<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Moscow Research Institute of Medical Ecology, Moscow, 117149 Russia, \*e-mail: vladimir-chernikov@rambler.ru, sergsev@inbox.ru; <sup>2</sup>Research Institute of Molecular Medicine, Sechenov Moscow Medical Academy, Moscow, 119991 Russia). We investigated ATP-ase and peptide-binding activity of recombinant human heat shock protein HSP70<sub>A1B</sub>, HSC70, and two hybrid proteins derived from those. The UV-spectral recorded data was used to characterize conformational rearrangements, which were induced by domain replacement or HSP70-peptide interaction. We have shown that N-terminal domain dramatically affect substrate specificity of C-terminal peptide-binding domain. This proposes new hypothesis for HSP70 chaperone machinery. The linear dependence between ATP-ase activity and peptide complex ratio was found. This relationship could be used for unlabeled peptide-HSP70 complex quantification.

**Keywords:** heat shock proteins, interdomain interactions, ATP-ase activity, UV-spectral analysis.

Белки теплового шока семейства HSP70 выполняют внутри клеток функции шаперонов, т.е. участвуют в первичном фолдинге и ренатурации белков, обеспечивают стабилизацию рецепторов и транспорт пептидов в различные клеточные компартменты. В настоящее время обнаружено 17 генов семейства HSP70 человека [1]. В настоящей работе исследовали наиболее широко распространенный конститутивный белок HSC70, продукт экспрессии

гена *hspA8*, и индуцибельный HSP70<sub>A1B</sub>, продукт экспрессии гена *hspA1B*. В структуре HSP70 имеется два основных домена – АТФазный и субстрат/пептид-связывающий. Дополнительно выделяют C-концевой субдомен, непосредственно участвующий в работе пептид-связывающего домена, и междоменную связку, которую считают структурным элементом, опосредующим взаимное влияние доменов [2].

Принятые сокращения: HSP (heat shock proteins) – белки теплового шока.

\* Эл. почта: vladimir-chernikov@rambler.ru; sergsev@inbox.ru

Исследовали, какой мотив пептидного фрагмента С-концевого субстрат-связывающего домена участвует, главным образом, в связывании. Использовали методы подбора синтетических пептидов [3], фаговых библиотек [4], поверхностного плазмонного резонансного анализа [5], а также анализа пептидов, элюированных из комплексов с HSP70 [6]. Показано, что HSP70 предпочтительно связывает семичленные гидрофобные пептиды, содержащие преимущественно аминокислоты с ароматическими радикалами, которые фланкированы положительно заряженными аминокислотами. Другие исследования пептид-связывающей способности HSP70 свидетельствуют о том, что важную роль в стабилизации комплексов играет С-концевой субдомен, образующий подобие крышки, закрывающей пептидный фрагмент внутри пептид-связывающего домена [7].

Работа шаперонной системы HSP70 имеет циклический характер, что достаточно подробно изучено на их бактериальном аналоге DnaK [8]. Как известно, наибольшим сродством к субстрат-связывающему домену HSP70 обладают гидрофобные пептидные фрагменты, экспонируемые на поверхности белков при нарушении третичной структуры. Стабилизация комплекса HSP70 с субстратом осуществляется за счет кошаперонов и за счет связывания ADP в АТРазном домене. Диссоциация шаперонного комплекса происходит при замене ADP на АТР. Захват белком HSP70 нового субстрата сопровождается гидролизом АТР [8].

Ранее изучали влияние на работу шаперонов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{PO}_4^{3-}$  [9, 10], а также феномен внутреннего обмена АТР-ADP в N-концевом домене. Однако, с нашей точки зрения, наиболее интересны и менее изучены механизмы взаимодействия АТРазного и субстрат-связывающего домена между собой. В настоящее время известно, что связывание любого из двух доменов с соответствующим субстратом приводит к индукции шаперонного цикла [8]. Полученные в работах зарубежных авторов данные свидетельствуют о наличии взаимного влияния доменов, которое опосредовано междоменной связкой [2, 11].

Большой научный и практический интерес представляют иммунные свойства и функции белков теплового шока семейства HSP70 [12–15], предпринимаются попытки создания вакцин на основе пептидных комплексов HSP70 [16–18]. Для разработки методик получения комплексов HSP70 с пептидами *in vitro* необходимы дополнительные исследования функциональных характеристик HSP70.

Данная работа посвящена изучению функциональных характеристик природных белков HSP70<sub>А1В</sub>, HSC70 и двух гибридных — HSP70<sub>НУВ</sub> и HSC70<sub>НУВ</sub>, названных по принадлежности входящего в их состав АТРазного домена, соединенного с

пептид-связывающим доменом HSC70 и HSP70<sub>А1В</sub> соответственно. С использованием генно-инженерных методов нами получены рекомбинантные белки человека HSC70 и HSP70<sub>А1В</sub> и их гибридные аналоги. Сравнительный анализ природных и гибридных белков позволяет оценить характер взаимного влияния доменов на проявление пептид-связывающей и АТРазной активности. Ранее изучение взаимодействия белков HSP70 с пептидными субстратами базировалось на использовании флуоресцентных методов. В данной работе макроструктурные изменения, вызванные искусственной заменой доменов, регистрировали по спектрам в УФ-области. Мы исследовали также спектральные изменения, возникающие при взаимодействии белков HSP70 с короткими пептидами различной природы. Полученные данные позволяют дополнить существующие представления о роли каждого из доменов в функционировании HSP70 в качестве молекулярных шаперонов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Конструирование экспрессионных плазмид.** Использовали стандартные генно-инженерные методы [19]. Тотальную РНК выделяли из лимфоцитов человека, подвергавшихся тепловому шоку (42°C, 10 мин). Комплементарную ДНК HSP70 синтезировали на мРНК с использованием праймера, комплементарного 3'-нетранслируемой области мРНК: 5'-GGCCCCСТААТСТАСС. ДНК HSP70 амплифицировали, используя следующие пары праймеров: 5'-САТАТGGGATCCGCCAAAGCCGCGG и 5'-GAAGTCCTGCAGCAGCTTCTGC (для синтеза 5'-концевого фрагмента транслируемой области подсемейства генов *hspA1B*, соответствующего АТРазному домену HSP70<sub>А1В</sub>); 5'-ТТТСАТАТGGGATCCAAGGGACCAGCAG и 5'-GTCCTGCAAGCTTCTGAAT (для синтеза 5'-концевого фрагмента транслируемой области гена *hspA8*, соответствующего АТРазному домену HSC70); 5'-GCAGAAGCTGCTGCAGGACTTC и 5'-AAGCTTTTТАГТ-СGACCTCCTCAATGC (для синтеза 3'-концевых фрагментов транслируемых областей генов *hspA1B* и *hspA8*, кодирующих пептид-связывающие домены HSP70<sub>А1В</sub> и HSC70 соответственно). Продукты амплификации клонировали в плазмиде pUC19 ("Fermentas", Литва) с использованием компетентных клеток штамма *E. coli* JM109. Полноразмерные последовательности транслируемых областей генов *hspA1B* и *hspA8*, а также их гибридных аналогов получали лигированием соответствующих АТР- и пептид-связывающих фрагментов по специфическому сайту рестрикции, находящемуся в области перекрытия этих фрагментов. Полученные ДНК встраивали в полилинкер экспрессионной плазмиды pQE80L ("Qiagen", США). Результирующие плазмидные ДНК pQE80-HSP70<sub>А1В</sub>, pQE80-HSC70, pQE80-HSP70<sub>НУВ</sub>, pQE80-HSC70<sub>НУВ</sub> трансфициро-

вали в клетки *E. coli* JM109, кодирующие рекомбинантные белки теплового шока человека HSP70<sub>А1В</sub>, HSP70<sub>НУВ</sub>, HSC70 и HSC70<sub>НУВ</sub>.

**Производство и очистка рекомбинантных белков HSP70.** Нарращивание биомассы штаммов-продуцентов и выделение рекомбинантных белков HSP70<sub>А1В</sub>, HSP70<sub>НУВ</sub>, HSC70 и HSC70<sub>НУВ</sub> проводили по ранее описанной методике [20]. Очищенные белки диализовали против 50 мМ буфера Трис-НСl, рН 8.0.

**АТФазную активность рекомбинантных белков HSP70** тестировали колориметрическим методом по их способности гидролизовать АТФ и накапливать в реакционной смеси неорганический фосфат [21]. АТФазную активность выражали в нмоль/мг мин по калибровочной кривой.

**Получение комплексов рекомбинантных белков HSP70 с пептидами.** Рекомбинантные белки HSP70<sub>А1В</sub>, HSP70<sub>НУВ</sub>, HSC70 и HSC70<sub>НУВ</sub> перед реакцией комплексообразования с синтетическими антигенными пептидами предварительно инкубировали в присутствии 2мМ АТФ при 37°C в течение 3 ч для освобождения от эндогенных бактериальных пептидов с последующим фильтрованием на ячейках Amicon Ultra-4 Ultracel-10k (“Sigma”).

Синтетические пептиды E7 (YMLDLQPETT), gp100 (ITDQVPFSV), NS5 (VVLDSLDPMV), HCV2a (YLLPRRGPRLL) и PSMA (ALFDIESKV) растворяли в 0.1 М растворе Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, рН 8.8, и смешивали с эквимольным количеством флуоресцеинизотиоцианата (FITC), предварительно растворенного в диметилсульфоксиде (ДМСО). Смесь инкубировали в течение 3 ч при перемешивании. Меченые пептиды отделяли на колонке C<sub>18</sub> методом ВЭЖХ, используя градиент элюции ацетонитрила (0–100%) в 0.1%-ной трихлоруксусной кислоте (ТХУ). Регистрировали поглощение волны 495 нм.

Комплексы HSP70<sub>А1В</sub>, HSP70<sub>НУВ</sub>, HSC70 и HSC70<sub>НУВ</sub> с пептидами получали, инкубируя 20 мкг каждого белка с 1.4 нмоль соответствующего пептида в конечном объеме 50 мкл в 0.05 М буфере Трис-НСl, содержащем 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2мМ АDR, в течение 30, 60, 90 и 120 мин. Несвязавшиеся пептиды удаляли с помощью аффинной хроматографии на сефарозе, активированной ионами Ni<sup>2+</sup> на Mini-spin фильтре (“Sigma”). Количество меченых FITC пептидов в образовавшихся комплексах с рекомбинантными белками определяли по оптическому поглощению при длине волны 495 нм.

**Определение кинетических параметров связывания белков с пептидами.** Данные о зависимости степени насыщения белков пептидами анализировали с помощью ПО OriginPro 8.0. Зависимость концентрации комплексов от времени совместной инкубации описывается функцией вида  $y = A(1 - e^{-kt})$ , где  $y$  — концентрация комплексов, нМ;  $A$  — предэкспо-

ненциальный множитель, определяющий максимальную асимптоту;  $k$  — показатель экспоненты.

Для эмпирического определения данных показателей исходные данные записали в виде матрицы {C<sub>комплексов</sub>; t инкубации}, после чего использовали регрессионный метод “nonlinear curve fit”-“BoxLucas1”. Эмпирические значения коэффициентов интерпретировали следующим образом:  $A = \frac{HSP_0 \cdot pep_0}{pep_0 + K_d}$ ,

где HSP<sub>0</sub> и pep<sub>0</sub> — исходные концентрации соответствующего белка и свободного пептида, а K<sub>d</sub> — равновесная константа диссоциации комплексов;  $k = k_{обр} \cdot pep_0 + k_{дисс}$ , где k<sub>обр</sub> и k<sub>дисс</sub> — константы скоростей образования и диссоциации комплексов соответственно. Значения K<sub>d</sub>, k<sub>обр</sub> и k<sub>дисс</sub> определяли путем решения соответствующих уравнений методом подстановки с использованием эмпирически определенных величин A и k.

**Получение и обработка УФ-спектров.** Макроструктурные изменения рекомбинантных белков, взятых в количестве 20 мкг, исследовали в 100 мкл 0.05 М буфера NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (рН 7.0) и 0.05 М буфера Трис-НСl (рН 7.0). УФ-спектр в диапазоне 200–380 нм с интервалом 1 нм снимали на спектрофотометре Smart Spec 3000 (“Bio-Rad”, США) в кювете объемом 100 мкл и длиной 10 мм.

Численные значения оптической плотности анализировали с помощью ПО OriginPro 8. Полученные спектры сглаживали, используя алгоритм Савитского–Голе (Sawitzki-Golay), размер сглаживающего окна — 5. Для определения положения и величин сдвига пиков применяли алгоритм поиска скрытых пиков с помощью второй производной, описанный ранее [22].

**Исследование динамики спектральных изменений.** К пробам, содержащим 20 мкг исследуемых рекомбинантных белков, добавляли 1.4 мкг соответствующего пептида и 0.05 М буфера Трис-НСl, рН 8.0, до конечного объема 100 мкл. УФ-спектр в диапазоне 200–380 нм с интервалом 1 нм снимали на спектрофотометре Smart Spec 3000 (“Bio-Rad”) в кювете объемом 100 мкл и длиной 10 мм в течение 180 мин с интервалом 10 мин. Численные значения оптической плотности анализировали и обрабатывали аналогично тому, как описано для получения УФ-спектров.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Получение рекомбинантных белков

На основе известных последовательностей мРНК HSP70<sub>А1В</sub> (GenBank NM\_005346) и мРНК HSC70 (GenBank NM\_006597) человека получали промежуточные плазмиды pUC-HSP70<sub>А1В(N)</sub>, pUC-HSP70<sub>А1В(C)</sub> и pUC-HSC(N), pUC-HSC70(C), содержащие нуклеотидные последовательности,

**Таблица 1.** Состав доменов исследуемых в работе рекомбинантных белков

Домены	АТФ-домен HSP70	АТФ-домен HSC70
С-домен HSP70	HSP70 <sub>А1В</sub>	HSP70 <sub>НУВ</sub>
С-домен HSC70	HSC70 <sub>НУВ</sub>	HSC70

Примечание. Серым выделены белки, соответствующие природным белкам.

которые соответствуют N-концевым и С-концевым доменам белков HSP70<sub>А1В</sub> и HSC70. С использованием клонированных фрагментов создавали экспрессионные плазмиды pQE80L-HSP70<sub>А1В</sub> и pQE80L-HSP70<sub>НУВ</sub>, pQE80L-HSC70 и pQE80L-HSC70<sub>НУВ</sub>, которые кодируют полноразмерные последовательности белков HSP70<sub>А1В</sub> и HSC70 человека и гибридные белки HSP70<sub>НУВ</sub> и HSC70<sub>НУВ</sub>, содержащие функциональные домены разных белков и названные по принадлежности N-концевого домена (табл. 1). Этими плазмидами трансформировали штамм *E. coli* JM109. Использование экспрессионного вектора pQE80L позволяет при трансляции получать белки с несколькими дополнительными аминокислотами на N-конце (обозначены курсивом): Met-*Arg-Gly-Ser-(His)<sub>6</sub>-Gly-Ser*. Наличие шести гистидиновых остатков позволяет легко и эффективно выделять рекомбинантные белки из биомассы методом металлохелатной хроматографии. Биосинтез целевых белков индуцировали добавлением изопротилтио-β-D-галактозида (ИПТГ), их масса достигает более 30% от суммарного клеточного белка (по данным электрофоретического анализа). При этом рекомбинантные белки накапливаются в клетках как в растворимой форме, так и в виде телец включения [20].

### Спектральные характеристики белков

Анализ спектров поглощения белков в УФ-области позволяет выявить и охарактеризовать макроструктурные изменения. Спектры рекомбинантных HSP70<sub>А1В</sub>, HSC70, HSP70<sub>НУВ</sub> и HSC70<sub>НУВ</sub> снимали в диапазоне 200–380 нм с шагом 1 нм при значениях рН 7.0 в буферных растворах 0.05 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и 0.05 М Трис-НСI. Спектры анализировали с применением алгоритма поиска скрытых пиков по второй производной при помощи ПО OriginPro 8 (рис. 1).

Мы обнаружили, что в присутствии ионов фосфата наблюдается дополнительный скрытый пик в области 210–212 нм, который сдвинут в более длинноволновую область. Такое изменение характери-

стик поглощения прослеживается у всех исследованных рекомбинантных белков, кроме HSC70<sub>НУВ</sub>. Эти данные позволяют предположить, что изменения в спектре связаны с перестройками, вызванными ионами фосфата в АТФ-разном домене белков [23]. При использовании фосфатного буфера форма триплета и положение скрытых пиков в области 210–230 нм наиболее сходны в спектрах белков HSC70 и HSP70<sub>НУВ</sub>. Сравнительный анализ спектров в буфере Трис-НСI показывает сходство HSP70<sub>А1В</sub> и HSC70. Пик при длине волны 220 нм существенно менее выражен, чем пик при длине волны 229 нм. В случае HSP70<sub>НУВ</sub> рассматриваемые пики примерно равны и значительно преобладает пик при длине волны 230 нм.

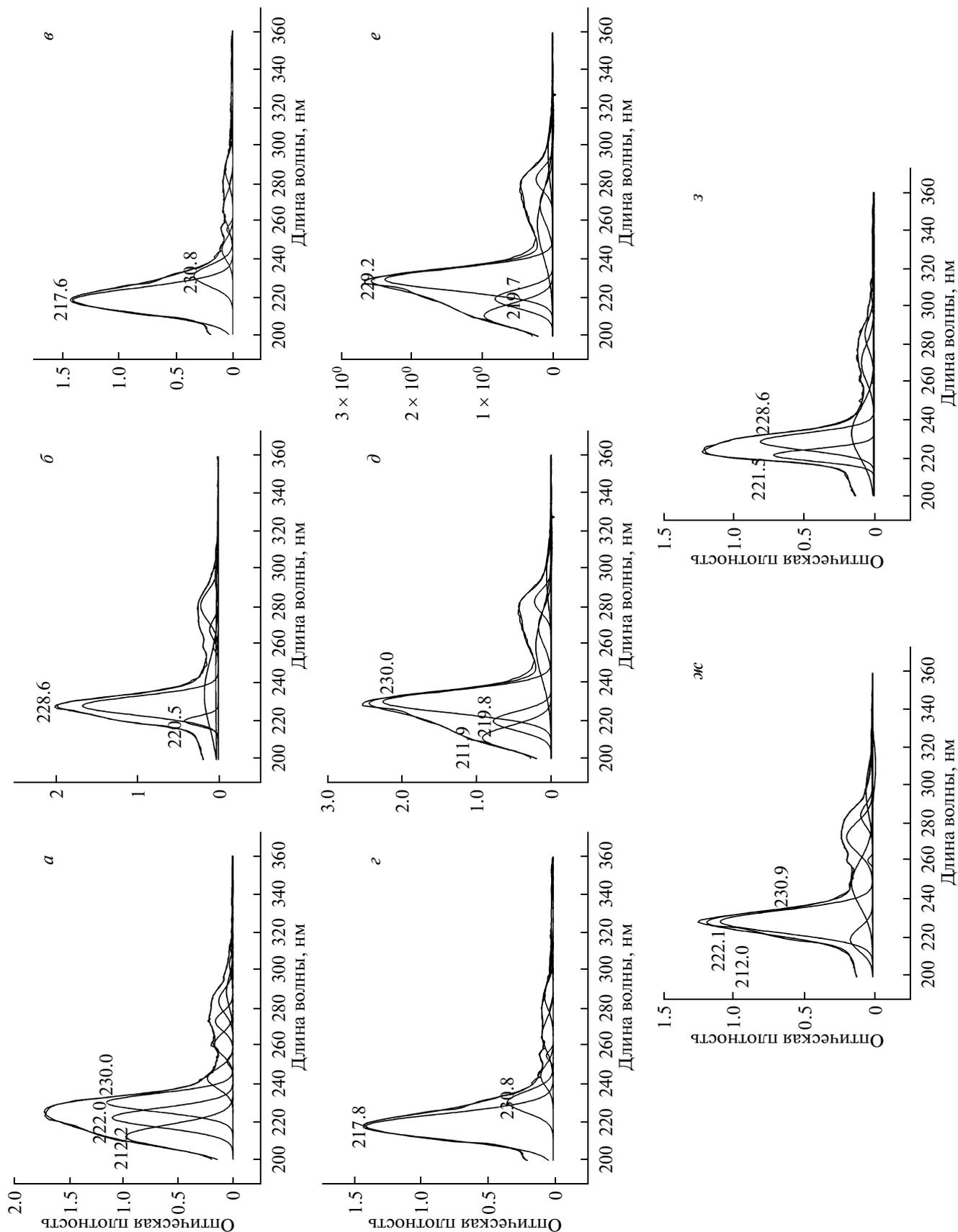
Таким образом, причину различий в спектральных характеристиках белков в области 210–230 нм не удается отнести к влиянию только одного из доменов, а, скорее, к характеру междоменных взаимодействий. Если данное предположение справедливо, то следует ожидать, что характер междоменных взаимодействий HSC70 и HSP70<sub>НУВ</sub> будет наиболее сходным, тогда как функционирование и характеристики HSC70<sub>НУВ</sub> и всех остальных белков будут, вероятно, отличаться.

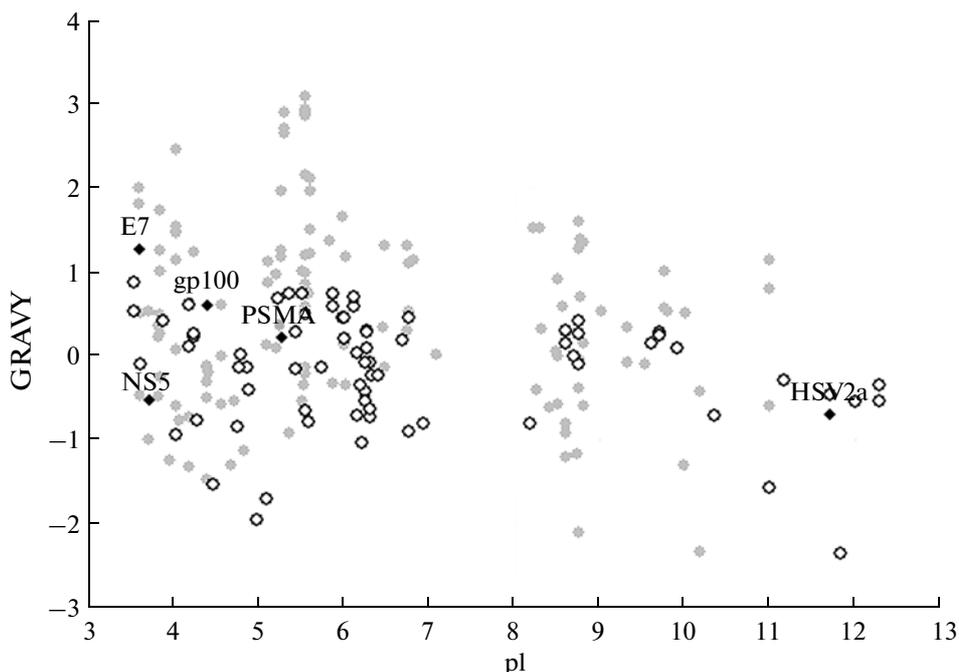
### Пептид-связывающая активность белков

Мы использовали рестриктированные пептиды HLA-A2, представляющие интерес для создания противоопухолевых и противовирусных вакцин (табл. 2). Выбранные пептиды существенно отличаются по гидрофобности и изоэлектрической точке (рис. 2). Рекомбинантные белки HSP70<sub>А1В</sub>, HSC70, HSC70<sub>НУВ</sub> и HSP70<sub>НУВ</sub> инкубировали в течение различных интервалов времени с пятикратным избытком FITC-меченого пептида в присутствии ADP, затем избыток пептида удаляли на Ni<sup>2+</sup>-сефарозе, а количество связавшегося с белком пептида определяли спектрофотометрическим методом.

В случае рекомбинантного белка HSC70<sub>НУВ</sub> не удалось обнаружить прочных комплексов ни с одним из исследуемых пептидов. Количество комплексов, образовавшихся в опытах с другими белками, отличается для каждой пары пептид–белок. Измеряя эти количества в течение 2 ч с интервалом 30 мин, мы построили кинетические кривые связывания белков HSP70<sub>А1В</sub>, HSC70, и HSP70<sub>НУВ</sub> с исследованными пептидами. По результатам этих опытов определяли константы диссоциации  $K_d$  для каждой пары пептид–белок (табл. 2). Здесь наблюдается следующая закономерность: сродство пептидов к белкам, имеющим одинаковый АТФ-разный домен (HSP70<sub>А1В</sub> и HSP70<sub>НУВ</sub>), увеличивается в ряду

**Рис. 1.** Суммарные спектры поглощения в УФ-области белков HSC70 (а, б), HSC70<sub>НУВ</sub> (в, г), HSP70<sub>А1В</sub> (д, е) и HSP70<sub>НУВ</sub> (ж, з). Спектры получены при рН 7.0 в фосфатном буфере (а, в, д и ж) и в буфере Трис-НСI (б, г, е и з).





**Рис. 2.** Распределение пептидов по гидрофильности (GRAVY, Grand average of hydropathicity, ордината) и изоэлектрической точке (pI, абсцисса): ● — HLA-A2-рестриктированные пептиды (<http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellpeptides.htm>); ○ — эндогенные пептиды, элюированные из комплексов с HSP70; ◆ — использованные в работе пептиды. Анализ аминокислотной последовательностей пептидов проводили с помощью утилиты ExPASy ProtParam Tool, предоставляющей возможность рассчитать теоретическую изоэлектрическую точку (pI) и параметр GRAVY.

E7<gp100<PSMA<HCV2a<NS5. Напротив, субстратные предпочтения у белков с одинаковыми пептид-связывающими, но разными АТРазными доменами (HSP70<sub>НУВ</sub> и HSC70) отличаются. Это дает основание предполагать, что именно структура АТРазного домена определяет преимущественное связывание определенных пептидов с различной структурой с С-концевым доменом.

### *Изменения спектральных характеристик белков, индуцируемых пептидами*

Далее исследовали влияние пептидов на спектральные характеристики рекомбинантных HSP70<sub>А1В</sub>, HSC70, HSC70<sub>НУВ</sub> и HSP70<sub>НУВ</sub>. Каждый из белков смешивали с пептидом в соотношении 1 : 5 в 0.05 М буфере Трис-НСl, рН 8.0, и выявляли положение скрытых пиков в области 280–290 нм и 290–

**Таблица 2.** Структура и аффинность пептидов, использованных в исследовании

Название	Происхождение	Структура	$K_d$ пептидных комплексов, нМ		
			HSP70 <sub>А1В</sub>	HSP70 <sub>НУВ</sub>	HSC70
E7	Папилломавирус человека	YMLDLQPETT	9.4 ± 0.3	5.6 ± 0.2	4.5 ± 0.3
gp100	Меланома	ITDQVPFSV	4.6 ± 0.1	2.8 ± 0.1	3.1 ± 0.1
HCV2a	Вирус гепатита С	YLLPRRGPRL	3.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1	10.2 ± 0.3
NS5	Вирус гепатита С	VVLDSLDPMV	2.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1	8.1 ± 0.1
PSMA	Рак простаты	ALFDIESKV	3.6 ± 0.1	3.2 ± 0.1	Н/Д

300 нм, которые соответствуют ароматическим аминокислотам Трг и Туг [22]. В полипептидной цепи каждого рекомбинантного белка содержится по два остатка Трг (по одному в АТРазном и субстрат-связывающем домене) и по 15 остатков Туг (десять — в АТРазном домене и пять в субстрат-связывающем соответственно). Опыты проводили в отсутствие АТР и АDP, так как эти соединения активно поглощают ультрафиолет в области 260–280 нм.

При исследовании динамики положения скрытых пиков Трг и Туг в течение 180 мин инкубации HSP70<sub>А1В</sub> с пептидами NS5, PSMA и E7 обнаружилось, что сдвиг пика Туг имеет волнообразный характер, а профиль изменений пика Трг различается в зависимости от структуры пептида (рис. 3).

Динамика сдвига пика Туг при взаимодействии HSP70<sub>А1В</sub> с пептидами E7 и NS5 можно описать общей формулой  $y = y_0 + A \sin\left(\pi \frac{x - xc}{w}\right)$ ; в этом случае

коэффициент корреляции  $r$  составляет 0.7 и 0.72 соответственно. В опыте с пептидом PSMA также наблюдаются волнообразные изменения, однако отмечается увеличение длины волны максимума поглощения в зависимости от времени инкубации. По прямой, отражающей уравнение линейной регрессии, оценивали динамику отклонения в зависимости от времени инкубации. Показано, что эта динамика также имеет волнообразный характер ( $r = 0.78$ ).

Период колебаний волновых функций составляет 40.2, 43.6 и 48.2 мин для пептидов NS5, PSMA и E7 соответственно. Выявить общую закономерность изменения положения пика Трг при взаимодействии HSP70<sub>А1В</sub> с пептидами не удалось.

Известно, что взаимодействие HSP70<sub>А1В</sub> в качестве шаперона с субстратом (в данном случае, — с пептидом) носит циклический характер. Время одного цикла *in vitro* в присутствии нуклеотидных факторов составляет около 30 мин [22]. Именно такой период рекомендуется выбирать при определении АТРазной активности HSP70. Отсутствие нуклеотидного субстрата и отклонение от оптимальной температуры, по нашему мнению, может приводить к увеличению продолжительности цикла конформационных изменений шаперона в экспериментальных условиях.

Таким образом, цикличность изменения положения пика Туг связана, вероятно, с индукцией циклических конформационных изменений при образовании комплексов пептидов с белками HSP70. Несколько отличный характер изменения пика Туг в случае с пептидом PSMA объясняется, по-видимому, участием тирозиновых остатков С-концевого домена в стабилизации комплексов HSP70<sub>А1В</sub> с PSMA. Циклические изменения наблюдаются на фоне снятия экранирования остатков Туг, что подтверждает высказанную гипотезу.

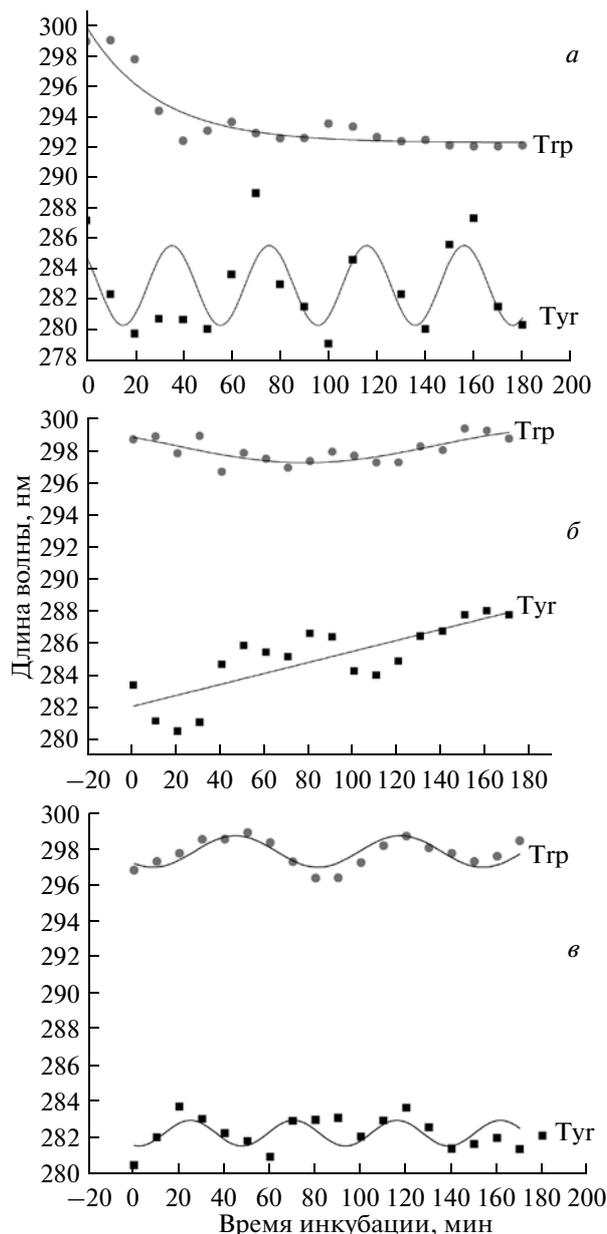
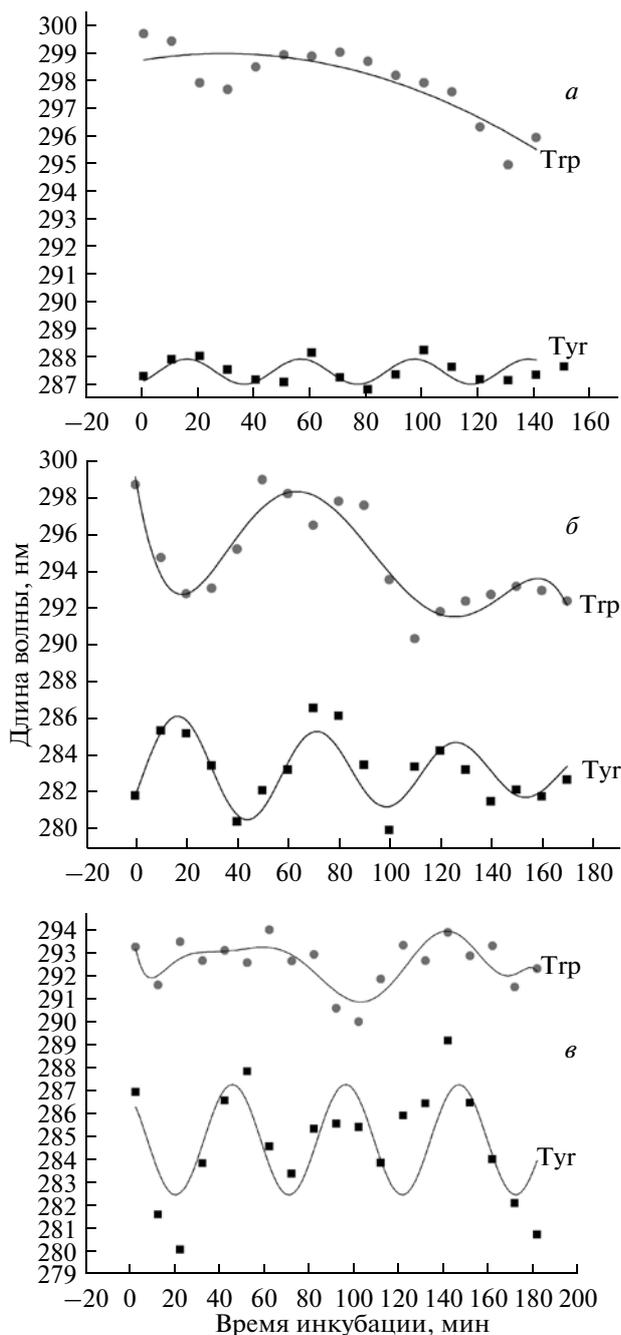


Рис. 3. Динамика изменений во времени положения пиков, соответствующих максимумам поглощения Туг и Трг, при инкубации белка HSP70<sub>А1В</sub> с пептидами NS5 (а), PSMA (б) и E7 (е).

Цикличность изменений тирозинового пика подтверждена и в опытах на остальных рекомбинантных белках при взаимодействии с пептидом NS5 (рис. 4). Следует отметить, что HSP70<sub>А1В</sub> и HSC70 характеризуются относительно коротким циклом (40.2 и 43.4 мин соответственно), тогда как время цикла у гибридных белков больше и составляет 50.8 мин для HSP70<sub>НУВ</sub> и 54.8 для HSC70<sub>НУВ</sub>. Время цикла зависит от ряда параметров, наиболее существенными из которых, по нашему мнению,



**Рис. 4.** Динамика изменений во времени положения пиков, соответствующих максимумам поглощения Тгр и Тгр<sub>г</sub>, при инкубации белков HSC70 (а), HSP70<sub>HYB</sub> (б) и HSC70<sub>HYB</sub> (в) с пептидом NS5.

являются характер и сила межмолекулярных взаимодействий, а также аффинность пептида.

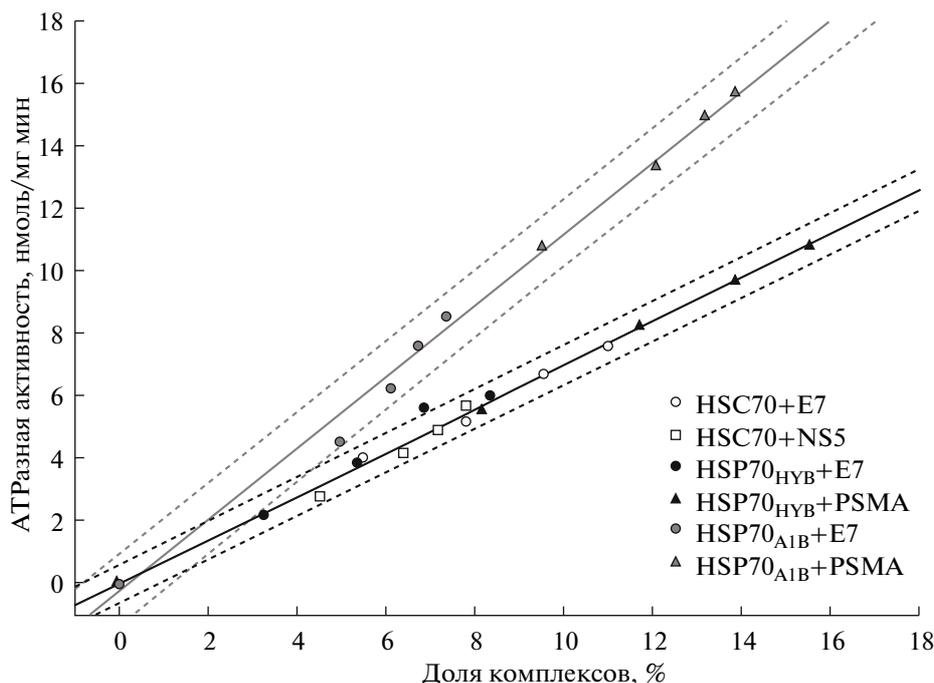
Индивидуальность профиля изменений пика Тгр в опытах с каждым из пептидов (рис. 4) дает возможность предположить, что лабильность субстрат-связывающего центра HSP70 достаточно высока. В случае HSP70<sub>А1В</sub>, HSC70 и HSP70<sub>HYB</sub> наблюдается общая тенденция к снижению длины волны

пика Тгр при образовании комплексов с пептидом NS5. Таким образом, можно предположить, что характер изменения длины волны триптофанового пика непосредственно определяется структурой пептида и характером его взаимодействия с HSP70 в субстрат-связывающем домене.

#### *АТРазная активность рекомбинантных белков*

Важная характеристика функциональной активности белков HSP70 — их способность гидролизовать АТФ до АДФ. АТРазную активность рекомбинантных HSP70 измеряли после этапов выделения и очистки рекомбинантных белков от бактериальных пептидов на ячейке Amicon Ultra-4 Ultracel-10k, а также каждый раз после процедуры получения и очистки комплексов. АТРазная активность белков после выделения из клеточной биомассы варьирует в пределах от 0.7 до 2.8 нмоль/мг мин. После трехчасовой инкубации с АТФ в концентрации 2 мМ и фильтрования через мембрану, пропускающую частицы с массой менее 10 кДа, АТРазной активности у белков практически нет. Потеря АТРазной активности белками в этих условиях, по-видимому, объясняется диссоциацией комплексов белков с эндогенными бактериальными пептидами. Это предположение согласуется с представлениями о работе шаперонной системы HSP70, согласно которым связывание HSP70 с АТФ приводит к высвобождению субстрата [8]. Неспособный связываться с пептидами гибридный белок HSC70<sub>HYB</sub> не проявляет АТРазной активности ни в одном из опытов, что также подтверждает предположение о зависимости между количеством комплексов пептидов в препарате HSP70 и величиной его АТРазной активности. Очищенные от свободного пептида комплексы белков с мечеными FITC пептидами E7, PSMA и NS5 обладают различной АТРазной активностью, причем ее уровень зависит от количества образовавшихся комплексов и имеет линейный характер (рис. 5).

Для подтверждения статистически достоверных различий между линейными зависимостями АТРазной активности от количества комплексов каждого из белков с пептидами использовали тест Чоу. Достоверных различий между сглаживающими прямыми, определяющими зависимость АТРазной активности HSP70<sub>А1В</sub> от количества образовавшихся комплексов с пептидами E7 и PSMA ( $p = 0.01$ ) не наблюдается. Более того, не было достоверных различий между сглаживающими прямыми, которые показывают зависимость АТРазной активности HSP70<sub>HYB</sub> и HSC70 от количества образовавшихся комплексов с пептидами E7, PSMA и E7, NS5 соответственно. Угловые коэффициенты зависимостей АТРазной активности от количества образовавшихся комплексов у белков HSP70<sub>А1В</sub> и HSP70<sub>HYB</sub> достоверно различаются.



**Рис. 5.** Зависимость АТРазной активности белков HSC70, HSP70<sub>HYB</sub> и HSP70<sub>A1B</sub> от содержания комплексов с мечеными пептидами E7, NS5 или PSMA в препарате белка. Прерывистыми линиями показан 95%-ный доверительный интервал.

Угловой коэффициент сглаживающей прямой, отражающей зависимость АТРазной активности препарата HSP70<sub>A1B</sub> от количества связанного пептида, равен 1.14. Аналогичный показатель для HSP70<sub>HYB</sub> и HSC70 составляет 0.7 (рис. 5).

В результате нашего исследования показана линейная зависимость АТРазной активности от количества белка, связавшегося с пептидом в диапазоне от 0 до 16% комплексов, независимо от природы связываемого пептида. Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что АТРазная активность HSP70, выделенного из *E. coli* или из ткани, определяется связанными с ним пептидами.

Данные об АТРазной активности выделенных из *E. coli* рекомбинантных HSP70 до проведения процедуры очистки их от эндогенных пептидов позволяют говорить о присутствии в препарате белка от 1 до 4% комплексов с бактериальными пептидами. Указанные ранее [10] значения АТРазной активности (15–20 нмоль/мг мин) дают основание предположить, что выделенный ими природный HSP70 загружен пептидами на 20–30%. Такие величины приведены другими авторами по результатам опытов с высоко аффинными пептидами при создании комплексов с рекомбинантными HSP70 *in vitro* [13, 15, 24]. Сопоставляя эти данные, можно предположить, что при выделении нативного белка из клеточных лизатов в составе комплексов с HSP70 остаются только пептиды, обладающие большей аффинностью [6].

Таким образом, удалось показать, что величина АТРазной активности белков семейства HSP70 линейно зависит от количества комплексов с пептидами, содержащимися в исследуемом препарате. Существенное влияние на активность N-концевого домена этих белков оказывает структура их C-концевого субстрат-связывающего домена.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами показано, что взаимодействие белков HSP70 с субстратами (ионами PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> и короткими пептидами) вызывает в белке макроструктурные перестройки. Характерно, что присутствие в среде иона фосфата (продукта реакции гидролиза АТФ) вызывает “красный сдвиг” в области около 220 нм, что говорит о снятии экранирования, в первую очередь, пептидных связей. Связывание же пептида (исходного субстрата для шаперонного цикла), как правило, приводит к дополнительному экранированию остатков Trp. При исследовании взаимодействия белков с пептидами обнаружены циклические колебания в положении пика Tug (около 280 нм). Они выражены тем сильнее, чем больше аффинность белка к пептиду, а изменение положения пика Tgr характерно для каждого из исследованных пептидов. Эти результаты дают основание предположить, что способность связывания белков HSP70 с разнообразными пептидами обусловлена исключительной лабильностью субстрат-связывающего домена,

который подстраивается под структуру каждого конкретного субстрата путем изменения пространственного положения тех или иных фрагментов собственной полипептидной цепи.

В опытах по получению пептидных комплексов белков HSP70<sub>А1В</sub>, HSC70 и HSP70<sub>НУВ</sub> с пептидами показано, что избирательность связывания С-концевого домена определяется АТРазным доменом. Несмотря на то, что именно он характеризуется наиболее высокой гомологией с белками семейства HSP70, по-видимому, именно его структурой обусловливается предпочтительное связывание пептидов различных  $\alpha$ -спиральных участков субстрат-связывающего домена. Присоединение к субстрат-связывающему домену белка несвойственного ему АТРазного домена значительно влияет не только на спектр предпочтительно связываемых пептидов, но и на собственно возможность связывания пептидов с субстрат-связывающим доменом, о чем свидетельствует потеря способности HSC70<sub>НУВ</sub> образовывать комплексы с каким-либо из исследованных пептидов. Ранее показано, что у бактериальных HSP70 имеются консервативные остатки аминокислот, отвечающие за вовлечение в процесс связывания пептидов тех или иных структур С-концевого домена [25]. Полученные нами данные дают основание предположить, что такие “ключевые” аминокислоты имеются и в эукариотических белках теплового шока, причем они могут находиться не только в субстрат-связывающем, но и в АТРазном домене. Именно такими аминокислотами, по-видимому, определяется лабильность отдельных  $\alpha$ -спиральных структур и, следовательно, способность их более или менее активно участвовать в образовании пептидных комплексов.

АТРазная активность полученных рекомбинантных белков индуцируется при связывании пептид-связывающего домена с субстратом. Ее величина зависит от количества пептидных комплексов в препарате белка и не зависит от природы пептида. Отсутствие различий между коэффициентами линейных зависимостей АТРазной активности от количества комплексов в препаратах белков HSC70 и HSP70<sub>НУВ</sub> свидетельствует об определяющем влиянии С-концевого домена на способность белка проявлять АТРазную активность. Расчет углового коэффициента прямой, отражающей зависимость АТРазной активности препарата белка от количества связанного пептида, позволяет в какой-то степени охарактеризовать силу междоменных взаимодействий в белках HSP70<sub>А1В</sub>, HSC70 и HSP70<sub>НУВ</sub>. Более высокое значение данной величины у HSP70<sub>А1В</sub> свидетельствует о более сильном влиянии субстрат-связывающего домена на АТРазный домен. Данные о структурных изменениях, происходящих с HSP70 при связывании его доменов с лигандами [11], дают возможность предположить, что усиление влияния субстрат-связывающего домена

на АТРазный является следствием более тесного сопряжения доменов, т.е. влияние конформационных изменений АТРазного домена на субстрат-связывающий в HSP70<sub>А1В</sub> также более выражено, чем в HSP70<sub>НУВ</sub>.

Создание гибридных белков HSP70 приводит к ослаблению сопряжения доменов, что в случае с HSC70<sub>НУВ</sub> выражается в полной потере активности всеми его центрами. В случае с HSP70<sub>НУВ</sub> уменьшается его способность проявлять АТРазную активность, однако количество пептидных комплексов, которое удается получить по сравнению с природным HSP70<sub>А1В</sub>, возрастает. Этот гибридный белок, по-видимому, медленнее переходит в “закрытую” форму, что позволяет ему более эффективно связывать пептиды, но, возможно, снижает прочность получаемых комплексов.

Обнаруженная зависимость между величиной АТРазной активности и содержанием комплексов в препарате индивидуальных HSP70 может быть использована для количественного определения немеченых пептидов в составе комплексов с HSP70.

Работа получила Государственную финансовую поддержку молодых российских ученых (МК-516.2011.7).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brocchieri L., Conway de Macario E., Macario A.J. 2008. hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evol. Biol.* **23**, 8–19.
2. Swain J.F., Dinler G., Sivendran R., et al. 2007. Hsp70 chaperone ligands control domain association via an allosteric mechanism mediated by the interdomain linker. *Mol. Cell.* **26**, 27–39.
3. Fourie A.M., Sambrook J.F., Gething M.J. 1994. Common and divergent peptide binding specificities of hsp70 molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* **269**, 30470–30478.
4. Arnaiz B., Madrigal-Estebas L., Todryk S., et al. 2006. A novel method to identify and characterise peptide mimotopes of heat shock protein 70-associated antigens. *J. Immun. Based Ther. Vaccines.* **4**, 2–14.
5. Maeda H., Sahara H., Mori Y., et al. 2007. Biological heterogeneity of the peptide-binding motif of the 70-kDa heat shock protein by surface plasmon resonance analysis. *J. Biol. Chem.* **282**, 26956–26962.
6. Grossmann M.E., Madden B.J., Gao F., et al. 2004. Proteomics shows Hsp70 does not bind peptide sequences indiscriminately *in vivo*. *Exp. Cell. Res.* **297**, 108–117.
7. Buczynski G., Slepnev S.V., Sehorn M.G., et al. 2001. Characterization of a lidless form of the molecular chaperone DnaK: deletion of the lid increases peptide on- and off-rate constants. *J. Biol. Chem.* **276**, 27231–27236.

8. Banecki B., Zylicz M. 1996. Real time kinetics of the DnaK/DnaJ/GrpE molecular chaperone machine action. *J. Biol. Chem.* **271**, 6137–6143.
9. Hiromura M., Yano M., Mori H., et al. 1998. Intrinsic ADP-ATP exchange activity is a novel function of the molecular chaperone, Hsp70. *J. Biol. Chem.* **273**, 5435–5438.
10. Macejak D., Rayfield M., Luftig R. 1990. Isolation and characterization of human HSP70 expressed in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **280**, 53–60.
11. Han W., Christen P. 2003. Interdomain communication in the molecular chaperone DnaK. *Biochem J.* **369**, 627–634.
12. Bausinger H., Lipsker D., Ziyhan U., et al. 2002. Endotoxin-free heat-shock protein 70 fails to induce APC activation. *Eur. J. Immunol.* **32**, 3708–3713.
13. Becker T., Hartl F.U., Wieland F. 2002. CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J. Cell. Biol.* **158**, 1277–1285.
14. Bendz H., Ruhland S.C., Pandya M.J., et al. 2007. Human heat shock protein 70 enhances tumor antigen presentation through complex formation and intracellular antigen delivery without innate immune signaling. *J. Biol. Chem.* **282**, 31688–31702.
15. Flechtner J.B., Cohane K.P., Mehta S., et al. 2006. High-affinity interactions between peptides and heat shock protein 70 augment CD8<sup>+</sup> T lymphocyte immune responses. *J. Immunol.* **177**, 1017–1027.
16. Goldstone S.E., Palefsky J.M., Winnett M.T., et al. 2002. Activity of HspE7, a novel immunotherapy, in patients with anogenital warts. *Dis. Colon. Rectum.* **45**, 502–507.
17. Noessner E., Gastpar R., Milani V., et al. 2002. Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells. *J. Immunol.* **169**, 5424–5432.
18. Triozzi P.L., Khurram R., Aldrich W.A., et al. 2000. Intratumoral injection of dendritic cells derived *in vitro* in patients with metastatic cancer. *Cancer.* **89**, 2646–2654.
19. Sambrook J., Russel D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
20. Савватеева Л.В., Гороховец Н.В., Черников В.А. и др. 2007. Получение рекомбинантного HSP70A1B человека. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* **3**, 38–42.
21. Chan K.M., Delfert D., Junger K.D. 1986. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.* **157**, 375–380.
22. Mach H., Middaugh C.R. 1994. Simultaneous monitoring of the environment of tryptophan, tyrosine, and phenylalanine residues in proteins by near-ultraviolet second-derivative spectroscopy. *Anal. Biochem.* **222**, 323–331.
23. Donovan J.W. 1973. Ultraviolet difference spectroscopy—new techniques and applications. *Methods Enzymol.* **27**, 497–525.
24. Moroi Y., Mayhew M., Trcka J., et al. 2000. Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexed to heat shock protein 70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 3485–3490.
25. Rüdiger S., Schneider-Mergener J., Bukau B. 2001. Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. *EMBO J.* **20**, 1042–1050.