

Фосфорилирование малого белка теплового шока с молекулярной массой 22 кДа (Hsp22, HspB8) сАМР-зависимой протеинкиназой

Шеметов Антон Александрович

студент

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова,

Биологический факультет, Москва, Россия

E-mail: antonbiochem@gmail.com

Малые белки теплового шока (sHsp) – большая и разнообразная группа белков, играющих значительную роль в защите клеток от неблагоприятных факторов, а также участвующих в процессах регуляции функционирования цитоскелета, клеточного цикла и апоптоза. Малые белки теплового шока могут подвергаться фосфорилированию под действием различных протеинкиназ, при этом оно может приводить к существенным изменениям структуры и свойств этих белков. Именно поэтому установление потенциальных участков фосфорилирования в структуре малых белков теплового шока является важным шагом в изучении механизма их функционирования. Недавно описанный малый белок теплового шока с молекулярной массой 22 кДа является малоизученным объектом. Оказалось, что в условиях *in vitro* Hsp22 эффективно фосфорилируется сАМР-зависимой протеинкиназой, способной переносить моль фосфата на моль белка. В структуре Hsp22 есть два остатка серина - Ser24 и Ser57, расположенные в консенсусной последовательности (RXS/T), узнаваемой сАМР-зависимой протеинкиназой. Для установления, какой из указанных остатков является предпочтительным участком фосфорилирования, были получены точечные мутанты S24D, S57D и S24,57D Hsp22. Оказалось, что скорость и степень фосфорилирования S24D мутанта не отличалась от скорости и степени фосфорилирования белка дикого типа, в то время как мутанты S57D и S24,57D практически не фосфорилировались сАМР-зависимой протеинкиназой. На основе этих данных сделан вывод о том, что сАМР-зависимая протеинкиназа фосфорилирует преимущественно Ser57 в структуре Hsp22. Точечные мутации, имитирующие фосфорилирование, или фосфорилирование сАМР-зависимой протеинкиназой сопровождалось 10-15% уменьшением триптофановой флуоресценции и изменением окружения определенных остатков триптофана Hsp22. Точечные мутации, имитирующие фосфорилирование, не влияли на скорость ограниченного трипсинолиза Hsp22. В то же время мутации, имитирующие фосфорилирование, уменьшали стабильность Hsp22 к химотрипсинолизу, при этом белок дикого типа обладает наибольшей стабильностью, а мутант S24,57D обладает наименьшей стабильностью. Данные, полученные методами химического сшивания и гель-фильтрации, свидетельствуют о том, что фосфорилирование (или мутации, имитирующие фосфорилирование) не влияют на четвертичную структуры Hsp22. Лизоцим, роданаза и инсулин были использованы в качестве модельных субстратов для изучения шаперонной активности Hsp22. Установлено, что Hsp22 и его мутанты не способны предотвращать агрегацию, вызванную восстановлением дисульфидных мостиков лизоцима. В то же время Hsp22 и его мутанты замедляли агрегацию, вызванную термоинактивацией роданазы, или агрегацию инсулина, вызванную восстановлением дисульфидных связей в его молекуле. В обоих случаях Hsp22 дикого типа обладал большей шаперонной активностью, чем его мутанты, имитирующие фосфорилирование, при этом наибольшая разница была выявлена при использовании инсулина в качестве модельного белка-субстрата. Сделан вывод о том, что фосфорилирование под действием сАМР-зависимой протеинкиназы (если оно происходит в клетке) может играть важную роль в регуляции активности Hsp22.

Работа поддержана грантом РФФИ 07-04-00115.