

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *NEFL* НА ТЕПЛОВУЮ ДЕНАТУРАЦИЮ БЕЛКА ЛЁГКОЙ ЦЕПИ НЕЙРОФИЛАМЕНТОВ

© 2023 В.В. Нефёдова^{1*}, Д.С. Ямпольская¹, С.Ю. Клейменов^{1,2},
Н.А. Чеботарева¹, А.М. Матюшенко¹, Д.И. Левицкий¹

¹ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
119071 Москва, Россия; электронная почта: victoria.v.nefedova@mail.ru

² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, Россия

Поступила в редакцию 04.01.2023

После доработки 02.03.2023

Принята к публикации 02.03.2023

Проведено исследование влияния аминокислотных замен E90K, N98S и A149V на структуру и тепловую денатурацию молекулы белка лёгкой цепи нейрофиламентов (NFL). Методом кругового дихроизма показано, что данные замены не приводят к изменению в спиральной структуре NFL, однако оказывают заметное влияние на стабильность молекулы. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии были идентифицированы калориметрические домены в структуре NFL и показано, что внесение замены E90K приводит к исчезновению низкотемпературного теплового перехода (домен 1). Внесение всех аминокислотных замен приводит к изменениям энтальпии плавления доменов NFL, а также к существенным изменениям температуры плавления некоторых калориметрических доменов. Таким образом, несмотря на то что все указанные аминокислотные замены, вызванные мутациями в гене *NEFL*, связаны с развитием нейропатии Шарко–Мари–Тута, а две из них даже располагаются очень близко друг к другу в суперспиральном участке 1A, они оказывают различное влияние на структуру и стабильность молекулы NFL.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: промежуточные филаменты, нейрофиламенты, суперспиральные белки, спектроскопия кругового дихроизма, дифференциальная сканирующая калориметрия.

DOI: 10.31857/S0320972523050044, EDN: AXKJLT

ВВЕДЕНИЕ

Промежуточные филаменты (ПФ) являются важным компонентом цитоскелета, наравне с микротрубочками и микрофиламентами. Для человека описано около 70 генов, кодирующих белки ПФ [1, 2]. Все белки семейства ПФ имеют сходные черты строения, в частности – наличие центрального α -спирального домена (так называемый god-домен). Для структуры ПФ характерны общие черты строения: наличие трёх α -спиральных участков (1A, 1B и 2), участвующих в образовании суперспиральных (coiled-coil) доменов, разделённых α -спиральными линкерными участками, которые не вовлечены в образование coiled-

coil [3, 4]. За образование суперспиральных участков отвечает god-домен ПФ, первичная структура которого организована в гептадные повторы, в которых аминокислотные остатки обозначаются латинскими буквами *a–g*. При этом в положениях *a* и *d* часто находятся гидрофобные остатки, участвующие в образовании гидрофобного кора, что позволяет god-доменам образовывать структуру coiled-coil. Димеры ПФ взаимодействуют антипараллельно и образуют тетрамер [3, 4]. Процесс полимеризации ПФ от димеров до зрелых филаментов проходит в три этапа [5–7]. На первом этапе происходит быстрое образование тетрамеров ПФ, затем за счёт латеральных взаимодействий происходит их сборка в ULF-частицы

Принятые сокращения: ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия; КД – круговой дихроизм; нейропатия ШМТ – нейропатия Шарко–Мари–Тута; ПФ – промежуточные филаменты; ΔH_{cal} – калориметрическая энтальпия; NFL, NFM и NFN – белки лёгкой, средней и тяжёлой цепей нейрофиламентов; NFL WT – белок NFL дикого типа; T_m – температура максимума теплового перехода; ULF – нити единичной длины, единичные протофиламенты.

* Адресат для корреспонденции.

(Unit Length Filaments, нити единичной длины) или единичные протофиламенты, диаметр которых превышает 10 нм, и, наконец, на последнем этапе происходит удлинение филаментов, их компактизация и уменьшение диаметра до стандартных 10 нм [7]. Принципы организации белков семейства ПФ в целом универсальны, однако для отдельных его представителей характерны уникальные свойства. Так, например, ламины не способны к латеральной полимеризации. Ввиду сложной организации белковых комплексов ПФ точечные аминокислотные замены даже в одном домене могут приводить к серьёзным изменениям, вплоть до потери мутантным белком способности полимеризоваться или к избирательному блокированию полимеризации на стадии ULF (замена Y117L — у виментина [8]). Наиболее изученными представителями семейства ПФ являются виментин, десмин и кератины, для которых получены кристаллические структуры отдельных суперспиральных участков, в том числе участков, ответственных за взаимодействие димеров и тетрамеров между собой [3, 4, 9]. На основании гомологии между ПФ можно предположить, что для нейрофиламентов будет характерен похожий принцип организации.

В зрелых нейронах экспрессируются пять белков ПФ — триада белков нейрофиламентов: белок лёгкой (NFL), средней (NFM) и тяжёлой (NFH) цепей, а также периферин и α -интернексин. Основное отличие трёх белков нейрофиламентов друг от друга определяется их С-концевыми доменами, которые различаются как по длине, так и по наличию важных участков фосфорилирования. Для белков NFM и NFH характерно наличие длинных С-концевых доменов, которые содержат KSP-повторы (Lys-Ser-Pro), являющиеся участками фосфорилирования (например, Erk1,2 киназами) [10,11]. В ранних работах по изучению структуры нейрофиламентов в нейронах было показано, что в клетках соотношение белков составляет 7/3/2 в расчёте на мономер NFL/NFM/NFH соответственно [10]. При этом структурно белки представлены гомодимерами NFL/NFL, а также гетеродимерами NFL/NFM и NFL/NFH [12, 13]. По сравнению с другими ПФ нейрофиламенты отличает их гетероолигомерная (гетеродимерная) структура, а также значительная протяжённость по всей длине аксона, которая требует развитой системы их транспорта. Однако *in vitro* только изолированный NFL может образовывать фибриллы, а изолированные NFM и NFH не способны полимеризоваться. *In vivo* в клетках линии SW13 Vim⁻, не экспрессирующих эндо-

генный виментин, было показано образование филаментоподобных структур, сформированных белком NFL [14]. В то же время для полноценной экспрессии NFL в нейронах необходимы белки NFM и NFH [15].

В настоящей работе мы сконцентрировались на изучении физико-химических свойств основного представителя нейрофиламентов — белка NFL. В гене *NEFL*, кодирующем этот белок, было обнаружено большое количество мутаций, приводящих к развитию наследственной нейропатии Шарко—Мари—Тута (ШМТ) [16]. Данное заболевание представляет группу патологий, которые делятся на два типа: демиелинизирующую и аксональную формы [16, 17]. Для нейропатии первого типа (ШМТ 1) характерно снижение проводимости нервного волокна, а второго типа (ШМТ 2) — дегенеративные процессы в аксоне без снижения проводимости импульса [18]. Известные мутации в гене *NEFL* можно разделить на несколько групп: 1) по месту их локализации в структуре белка NFL или 2) по типу заболевания Шарко—Мари—Тута, которое они вызывают: демиелинизирующую (1F) или аксональную (2E) формы [17, 19, 20]. Для ряда мутантных белков NFL (P8Q, E90K, N98S, A149V) в клеточных линиях была продемонстрирована агрегация, которую в большинстве случаев удавалось устранить, коэкспрессируя в клетках NFL и NFM [21–24]. При этом для трёх мутантных белков (N98S, Q332P, E397K) для предотвращения агрегации была необходима экспрессия сразу трёх белков промежуточных филаментов (NFL, NFM и периферина) [22]. Для белка NFL с заменой N98S было показано нарушение сборки филаментов и образование агрегатов белка как в культурах клеток, так и в нейронах мышей [23]. Помимо этого, на мышинной модели гетерозиготной особи N98S/WT наблюдался выраженный тремор и накопление агрегатов в мозжечке и спинном мозге. В то же время в некоторых работах не наблюдали патологической агрегации мутантных белков внутри клеток, но детектировали заметное уменьшение миелиновой оболочки аксонов [25]. Противоречия в накопленных данных поднимают ряд вопросов. Так, очевидно, является ли образование агрегатов следствием нарушения сворачивания белка или это вызвано нарушениями в его взаимодействии с белками-партнерами?

В качестве объектов исследования в настоящей работе были выбраны белки, содержащие аминокислотные замены в α -спирали 1A (E90K и N98S) и в α -спирали 1B (A149V) (рис. 1). Для данных мутантных форм NFL

ранее было показано нарушение сборки полимеров *in vivo* [21, 22, 24], выражающееся в образовании очень коротких полимеров или агрегатов белка в клетках. Для изучения причин патогенных свойств данных аминокислотных замен в NFL необходимо определить, какое влияние они оказывают на структуру белка. Положение аминокислотных остатков в гептадах определяет структуру и свойства суперспиральных белков, в том числе стабильность структуры coiled-coil, что, в свою очередь, может оказывать влияние и на свойства олигомеров NFL. Учитывая, что исследуемые замены расположены в гептадных повторах в положениях *d* (E90K), *e* (N98S) и *g* (A149V), т.е. в тех положениях, в которых находящиеся там остатки могут оказывать влияние на стабильность двойной спирали, можно предположить, что замены E90K, N98S и A149V (рис. 1) могут приводить к изменениям структуры coiled-coil NFL. В пользу такого предположения говорят полученные ранее данные о том, что замены аминокислотных остатков не только в положениях *a* и *d* гептадных повторов, но и в положениях *e* и *g* могут оказывать серьёзное влияние на стабильность (термостабильность) двойной спирали молекулы тропомиозина [26–31]. Проверка этого предположения и явилась главной задачей данной работы. Для этого мы исследовали влияние этих замен на характер тепловой денатурации белка NFL методами кругового дихроизма (КД) и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение белков. Все препараты белков NFL, использованные в данной работе, были рекомбинантными белками, продуктами гена *NEFL* человека (UniProt P07196).

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	Последовательность праймеров 5'→3'
F1	GACCTCAGTGACCGCTTCGCCAGCT
R1	CTGGAGCTGCGCCTTCTCCTGCGT
F2	ACGCAGAAGAAGGCGCAGCTCCAGGA
R2	GCGGATGGACTTGAGGTCGTTGCTGA
F3	CTGGTGCGGGAAGATGCCACC
R3	GCGCAGGTCGCGGATCTCCTG

Примечание. Кодоны, в которые были внесены мутации, подчеркнуты.

NFL дикого типа (NFL WT) и мутантные формы были клонированы в вектор EV («Клонинг фасилити», Россия). Для внесения точечных аминокислотных замен был использован Q5-site directed mutagenesis kit («NEB», США) и подобранные наборы праймеров. Для внесения замены N98S использовали праймеры F1 и R1; для внесения замены E90K использовали праймеры F2 и R2; для внесения замены A149V использовали праймеры F3 и R3. Последовательности праймеров («Евроген», Россия) представлены в табл. 1.

Все полученные конструкции были использованы для бактериальной экспрессии белков в клетках *Escherichia coli* штамма C41. Выделение и очистку всех рекомбинантных белков NFL проводили из фракции телец включения. После разрушения клеток ультразвуком тельца включения осаждали центрифугированием при 18 000 g. Осадок телец включения, содержащий белок NFL WT или его мутантные формы, растворяли в 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), содержащем 8 M мочевины, 2 mM EGTA, 15 mM β-ME,

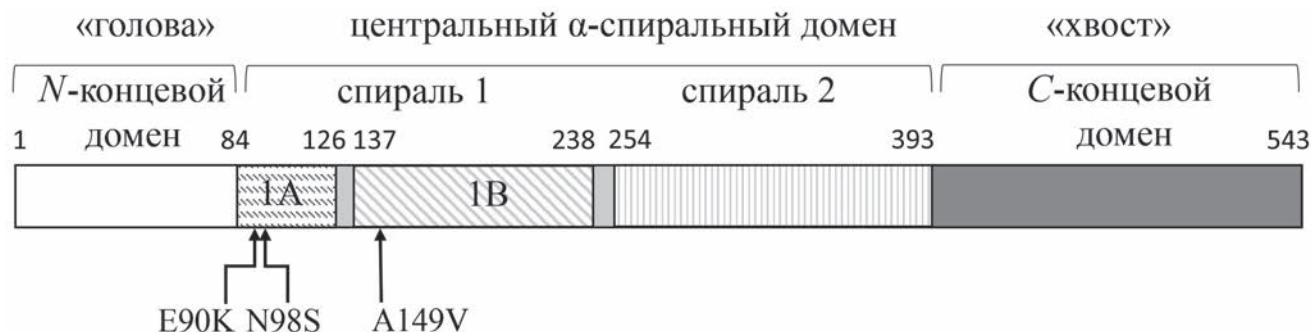


Рис. 1. Схема строения молекулы NFL. Стрелками отмечены положения аминокислотных замен E90K, N98S и A149V в спиральных участках 1A и 1B

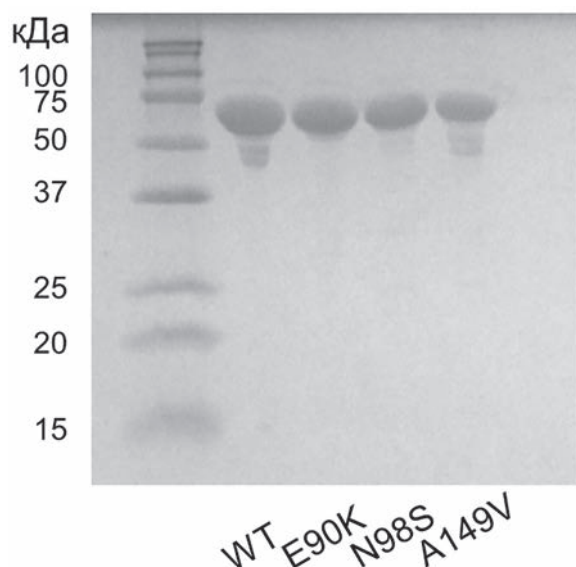


Рис. 2. Анализ чистоты полученных препаратов NFL WT и мутантных форм методом SDS-электрофореза в ПААГ

0,1 mM PMSF (буфер А), и подвергали ультрацентрифугированию при 105 000 g. Супернатант наносили на колонку HiTrap Q («GE Healthcare», США), уравновешенную буфером А. Элюцию проводили линейным градиентом NaCl в диапазоне 0–0,7 M NaCl. Концентрацию белков определяли спектрометрическим методом, используя коэффициент экстинкции $A_{1\%}^{1\text{cm}}$ при 280 нм, равный $5,9 \text{ cm}^{-1}$. Полученные препараты хранили при -80°C . Чистота полученных препаратов составила не менее 95% (рис. 2).

Ренатурацию белков проводили перед экспериментами путём диализа против 5 mM Hepes/NaOH (pH 8,0), содержащего 0,5 mM EGTA и 2 mM DTT в течение ночи при 4°C .

Аналитическое ультрацентрифугирование (AUC). Эксперименты по скоростной седиментации (SV) проводили в аналитической ультрацентрифуге, модель Е («Beckman», США), оснащённой абсорбционной оптикой, фотоэлектрическим сканером, монохроматором и компьютером в режиме онлайн. Аналитическое ультрацентрифугирование проводили при концентрации белка 1 мг/мл в 5 mM Tris-HCl (pH 8,0), содержащем 0,5 mM EGTA и 2 mM DTT. В опытах использовали титановый ротор An-G Ti и двухсекторные ячейки. Седиментационные профили регистрировали путём измерения оптического поглощения при 280 нм. Все ячейки сканировались одновременно с интервалом в 2,5 мин. Дифференциальные распределения по коэффициентам седиментации $[s-g^*(s) \text{ vs } s]$ были определены при 25°C с помощью программы SEDFIT [32].

Метод спектроскопии кругового дихроизма.

Спектры КД белков NFL регистрировали в диапазоне 190–280 нм при 5°C на спектрометре Chirascan CD («Applied Photophysics», Англия) при длине оптического пути 0,02 см. Время регистрации сигнала для каждой длины волны составляло 5 сек. Для каждого препарата было получено не менее 5 записей спектров КД. Все эксперименты проводили при концентрации белков 1 мг/мл в 5 mM Hepes (pH 8,0), содержащем 0,5 mM EGTA и 2 mM DTT. Температурные зависимости тепловой денатурации белков регистрировали при постоянном нагреве со скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ в диапазоне $5\text{--}85^\circ\text{C}$ при длине волны 222 нм.

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии.

Эксперименты методом ДСК проводили с использованием дифференциального сканирующего микрокалориметра MicroCal VP-Capillary («Malvern Instruments», США) с капиллярными измерительными ячейками. Нагрев образцов проводили с постоянной скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ от 10 до 85°C . Все эксперименты проводили при концентрации белков 2 мг/мл в 5 mM Hepes (pH 8,0), содержащем 0,5 mM EGTA и 2 mM DTT. Для всех препаратов было произведено не менее трёх прогревов. Для изучения обратимости денатурации препараты подвергали двум последовательным прогревам. Процедуру деконволюции, т.е. разложения кривых теплопоглощения на отдельные тепловые переходы (калориметрические домены), проводили в программе Origin 7.0 путём подгонки данных к модели для анализа мультидоменных белков (non-two-state model) [33]. Этот математический подход, основанный на классической работе Freire и Biltonen [33], был заложен в используемый нами программный пакет «Origin 7.0» как «модуль ДСК». Этот модуль позволяет проводить не только деконволюцию кривых ДСК, полученных для обратимо денатурирующих белков, но и целый ряд иных важных процедур обработки этих кривых. Так, к примеру, он позволяет построить (и впоследствии вычесть из кривой теплопоглощения) так называемую «химическую базовую линию» (chemical baseline), соединяющую состояния нативного и полностью денатурированного белка. Он также позволяет точно определить температуру максимума теплового перехода (T_m) для каждого теплового перехода и его калориметрическую энтальпию (ΔH_{cal}), представляющую интеграл избыточной теплоёмкости по температуре в пределах температурного диапазона денатурации одного калориметрического домена или целой молекулы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Белок NFL относится к семейству белков ПФ и имеет характерные для белков этого семейства суперспиральные участки. Однако отличительной особенностью именно белков ПФ является их способность к полимеризации и образованию различных олигомерных структур. Ранее для бычьего белка NFL было показано формирование низкомолекулярных олигомеров — тетрамеров — в буферном растворе с низкой ионной силой [34]. Коэффициент седиментации олигомеров белка NFL WT человека, полученный в аналогичных условиях методом скоростной седиментации, составил 7,3 S (рис. 3). Ранее с использованием равновесного ультрацентрифугирования было проведено определение молекулярной массы олигомеров других ПФ — виментина и десмина, полученных в похожих условиях [35], и показано, что при низкой ионной силе (5 mM Tris-HCl) образуются олигомеры, молекулярная масса которых соответствует тетрамерам этих белков, однако коэффициенты седиментации тетрамеров виментина и десмина существенно зависят от pH, что указывало на разную степень жёсткости, размер или форму образуемых олигомеров. При pH 8 коэффициент седиментации тетрамеров виментина составил 4,7 S, а при pH 7,5 — 5,5 S [35]. В последующей работе тех же авторов было показано, что при изменении условий (в частности, при повышении концентрации белка до 0,5 мг/мл и проведении эксперимента в присутствии EDTA) коэффициент седиментации виментина повышался до 7,2 S [36], т.е. почти

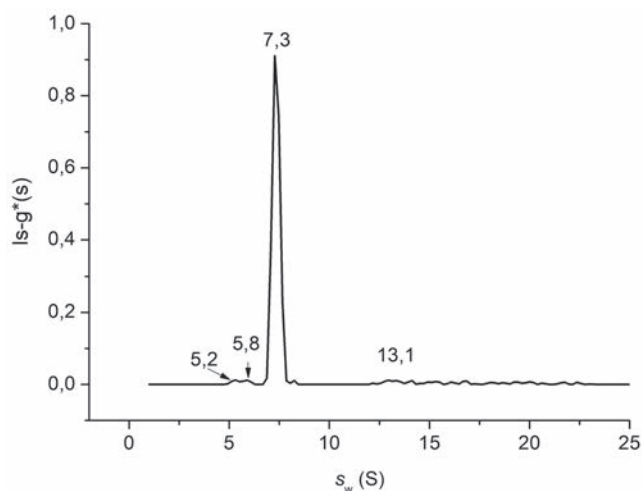


Рис. 3. Анализ олигомерного состояния белка дикого типа NFL WT (1 мг/мл) методом аналитического ультрацентрифугирования. Показано распределение по коэффициентам седиментации $ls-g^*(s)$. Скорость вращения ротора — 48 000 об./мин

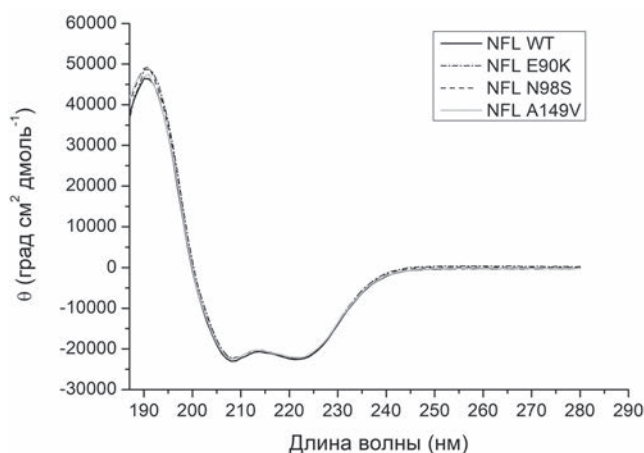


Рис. 4. Спектры кругового дихроизма NFL WT и мутантных белков NFL с заменами E90K, N98S и A149V, зарегистрированные при 5 °C

не отличался от значения 7,3 S, определённого в нашей работе для NFL, концентрация которого составляла 1 мг/мл (рис. 3).

Учитывая преобладание главного пика 7,3 S на распределении $ls-g^*(s)$ NFL WT (рис. 3), можно заключить, что в используемых условиях этот белок находился преимущественно в форме олигомеров, соответствующих тетрамерам белка NFL. В минорных количествах присутствовали также другие олигомерные формы с коэффициентами седиментации 5,2; 5,8 или 13,2 S (каждая форма < 2%). В настоящее время мы можем лишь предположить, что тетрамерное состояние сохраняется и для мутантных форм NFL (для убедительного доказательства этого предположения требуются дополнительные эксперименты, которые в дальнейшем планируется провести). Тем не менее мы можем достаточно уверенно утверждать, что ни NFL WT, ни его мутантные формы в используемых условиях не образовывали высокомолекулярных олигомеров (ULF и филаментов), что подтверждалось полным отсутствием осадков после высокоскоростного (при 105 000 g) препаративного центрифугирования препаратов (данные не приведены). Важно отметить, что тетрамерная форма ПФ может существовать не только *in vitro*, но и *in vivo* [37], что позволяет рассматривать её как минимальную структуру для изучения свойств NFL.

Регистрация спектров КД NFL WT и всех мутантных белков показала наличие характерных для α -спиральных белков отрицательных максимумов молярной эллиптичности при 208 и 222 нм (рис. 4), при этом, по данным расчёта в программе DichroWeb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>), структура NFL примерно на 52–56% представлена α -спиральными участками.

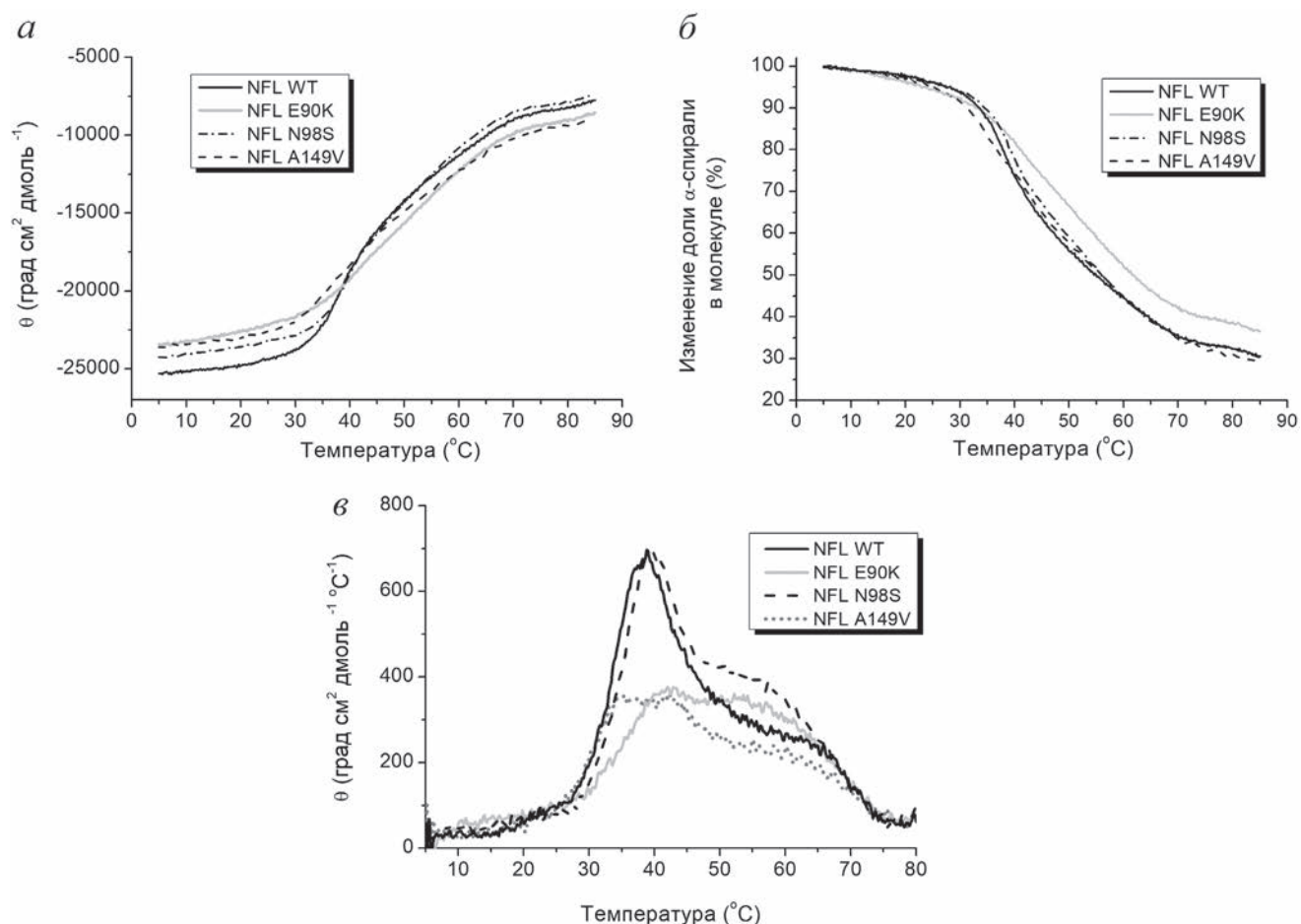


Рис. 5. Тепловая денатурация белка NFL WT и его мутантных форм E90K, N98S и A149V, измеренная методом КД. *a* – Температурные зависимости изменения молярной эллиптичности NFL WT и мутантных белков, зарегистрированные при 222 нм. *б* – Температурные зависимости изменения доли α -спирали в молекуле NFL. За 100% принята спиральность молекулы NFL при 5 °C, соответствующая ~ 50% спиральности белка. *в* – Первые производные температурных зависимостей эллиптичности, представленных на панели (*a*)

В первую очередь мы исследовали тепловую денатурацию целой молекулы NFL WT и её мутантных форм, регистрируя изменение молярной эллиптичности при 222 нм в диапазоне температур 5–85 °C (рис. 5, *a*). Оказалось, что плавление молекулы NFL WT происходит постепенно и имеет несколько выраженных тепловых переходов (рис. 5, *a–в*). С использованием первой производной зависимости, представленной на рис. 5, *a*, было показано наличие теплового перехода при ~ 38 °C, а также более высокотемпературного «плеча» (рис. 5, *в*). Тепловая денатурация мутантного белка с заменой N98S очень похожа на таковую для белка дикого типа и также имеет выраженный переход при ~ 39 °C. Методом КД для мутантного белка с заменой E90K были обнаружены тепловые переходы при ~ 42 °C и ~ 55–57 °C. Для белка NFL с заменой A149V были обнаружены тепловые переходы при ~ 35 °C и ~ 42 °C (рис. 5, *в*). При этом для всех белков NFL характерна обратимость тепловой

денатурации: после нагрева и последующего охлаждения спектры КД этих белков демонстрировали всё те же отрицательные максимумы при 208 и 222 нм, характерные для α -спиральных белков.

Для того чтобы провести точную идентификацию тепловых переходов в молекуле NFL, мы использовали метод ДСК, который позволяет регистрировать температурные зависимости избыточного теплопоглощения молекулы белка при его тепловой денатурации. Плавление NFL было полностью обратимо, что позволило нам провести компьютерную деконволюцию кривых избыточного теплопоглощения NFL WT и его мутантных форм, т.е. разложение этих кривых на отдельные тепловые переходы (калориметрические домены), отражающие денатурацию различных участков белка, которые плавятся кооперативно и независимо друг от друга. Полученные данные представлены на рис. 6 и в табл. 2.

Таблица 2. Калориметрические параметры, полученные методом ДСК для индивидуальных тепловых переходов (калориметрических доменов) белка NFL дикого типа и его мутантных форм*

NFL	Нумерация доменов	T_m # (°C)	$\Delta H_{cal}^{\S}$ (кДж моль ⁻¹)	ΔH_{cal} (% от общей ΔH_{cal})	Общая ΔH_{cal} (кДж моль ⁻¹)
NFL WT	Домен 1	33,2	35	3	1190
	Домен 2	41,7	495	42	
	Домен 3	53,6	430	36	
	Домен 4	63,2	230	19	
NFL E90K	Домен 2	41,6	150	20	745
	Домен 3	52,2	410	55	
	Домен 4	62,6	185	25	
NFL N98S	Домен 1	34,2	60	6	1080
	Домен 2	41,0	295	27	
	Домен 3	50,4	530	49	
	Домен 4	62,5	195	18	
NFL A149V	Домен 1	31,1	80	10	770
	Домен 2	40,7	170	22	
	Домен 3	47,5	345	45	
	Домен 4	63,2	175	23	

Приложение. * Параметры получены на основании данных, представленных на рис. 6.

Погрешность приведённых значений температуры калориметрических доменов (T_m) не превышала $\pm 0,2$ °C.

§ Погрешность приведённых значений калориметрической энтальпии (ΔH_{cal}) не превышала 10%.

По результатам деконволюции для NFL WT были определены 4 калориметрических домена с температурами полупереходов при 33,2 °C, 41,7 °C, 53,6 °C и 63,2 °C. Формы графиков первой производной изменения молярной эллиптичности при 222 нм (рис. 5, в) и температурных зависимостей избыточного теплопоглощения белка NFL WT и его мутантов (рис. 6) в целом очень похожи и демонстрируют наличие одинаковых тепловых переходов. Метод КД позволяет регистрировать денатурацию α -спиралей NFL, в то время как метод ДСК – разрушение структуры coiled-coil. Схожесть температурных зависимостей, полученных этими двумя методами, указывает на то, что разрушение структуры coiled-coil происходит одновременно с плавлением α -спиралей.

Для всех мутантных белков, кроме NFL E90K, также были определены 4 калориметрических домена. Для мутантного белка NFL E90K было показано отсутствие калориметрического домена 1 (рис. 6, табл 2). Важно отметить, что, несмотря на то что все исследованные в работе

аминокислотные замены расположены в спиральных участках 1A и 1B (рис. 1), перераспределение калориметрических доменов произошло только в случае одной аминокислотной замены – E90K. Поскольку эта замена расположена в спиральном участке 1A (рис. 1), можно предположить, что калориметрический домен 1 отражает денатурацию этого участка молекулы NFL. При внесении двух других замен (N98S и A149V) происходили изменения энтальпии отдельных калориметрических доменов, но их количество не менялось. Наименьшие изменения температуры полуперехода мы наблюдали для доменов 2 и 4. Для белков NFL WT и его мутантов значение T_m домена 2 находится в диапазоне 40,7–41,7 °C, а домена 4 – в диапазоне 62,5–63,2 °C. В то же время внесение мутаций привносит заметные изменения в калориметрический домен 3. Так, значение T_m этого домена в случае белка дикого типа составляет 53,6 °C, тогда как для мутантного белка с заменой A149V оно гораздо ниже и составляет 47,5 °C.

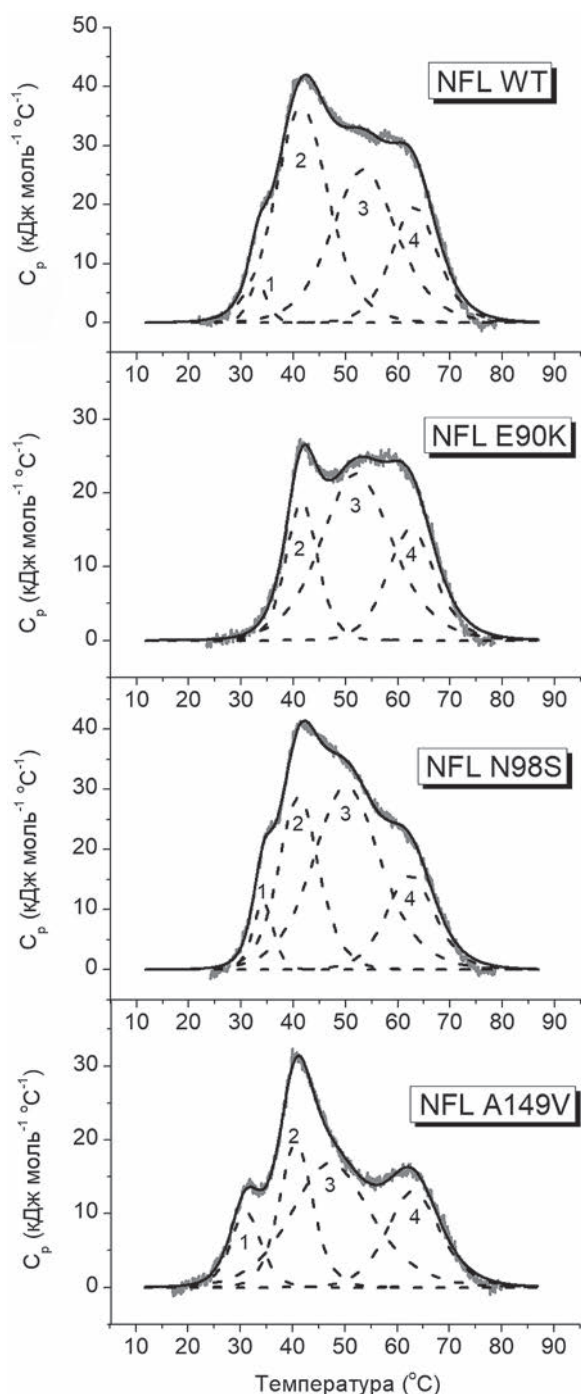


Рис. 6. Температурные зависимости избыточного теплопоглощения белка NFL WT и его точечных мутантов, полученные методом ДСК. Сплошными линиями обозначены оригинальные записи кривых избыточного теплопоглощения, а пунктирными линиями — calorиметрические домены, выявленные путём деконволюции этих кривых. Нумерация доменов соответствует их нумерации в табл. 2

Таким образом, основные изменения в тепловой денатурации NFL при внесении аминокислотных замен затрагивают calorиметрические домены 1 и 3. Для объяснения возможных причин тех структурных измене-

ний, которые могут происходить при внесении аминокислотных замен в NFL, обратимся к структуре ПФ.

Первичная структура α -спиральных участков белков семейства ПФ демонстрирует классическое для всех таких белков распределение аминокислотных остатков в гептадных повторах [26]. При этом каждый аминокислотный остаток выполняет конкретную роль в стабилизации суперспиральной структуры [26, 38]. Для белка виментина ранее были получены кристаллические структуры отдельных фрагментов и показано распределение аминокислотных остатков в спиральях 1А и 1В (рис. 7) [3]. Выравнивание первичных структур виментина и NFL показало, что спирали 1А и 1В демонстрируют высокую степень гомологии, на основании чего мы предположили, что аминокислотным остаткам в гептадах суперспиральных участков NFL будут соответствовать те же положения (*a–g*), что и в виментине. Если это так, то E90 находится в положении *d*, N98 находится в положении *e*, а A149 — в положении *g* (рис. 7). Замена E90K, обнаруженная у пациентов с нейропатией Шарко–Мари–Тута, приводит к исчезновению calorиметрического домена 1 на термограмме NFL (рис. 6, табл. 2), что может указывать на изменения в структуре суперспирального участка 1А, например, на его чрезмерную стабилизацию или, наоборот, дестабилизацию. Традиционно считается, что в положениях *a* и *d* суперспиральных белков должны находиться гидрофобные аминокислотные остатки, стабилизирующие суперспиральную структуру, однако для многих белков промежуточных филаментов (виментина, глиального фибриллярного белка, периферина, десмина) в положении, гомологичном E90 в NFL, также находится остаток глутамина [3]. При этом для остальных остатков в спирали 1А соблюдается правило, что в положениях *a* и *d* должны находиться гидрофобные аминокислотные остатки (рис. 7, *a*). Несмотря на то что аминокислотный остаток E90 не является гидрофобным, по-видимому, он также играет важную роль в стабилизации суперспиральной структуры домена 1А за счёт электростатических взаимодействий, так как в положении *d* в гидрофобной коре ему соответствует R86 (рис. 7, *b*). Внесение замены E90K должно приводить к локальному расхождению двух α -спиралей за счёт появления дополнительного положительного заряда K90 и дестабилизации этого участка структуры. Важно отметить, что для представителей семейства ПФ характерна полимеризация, и в ряде работ высказывается мнение, что именно

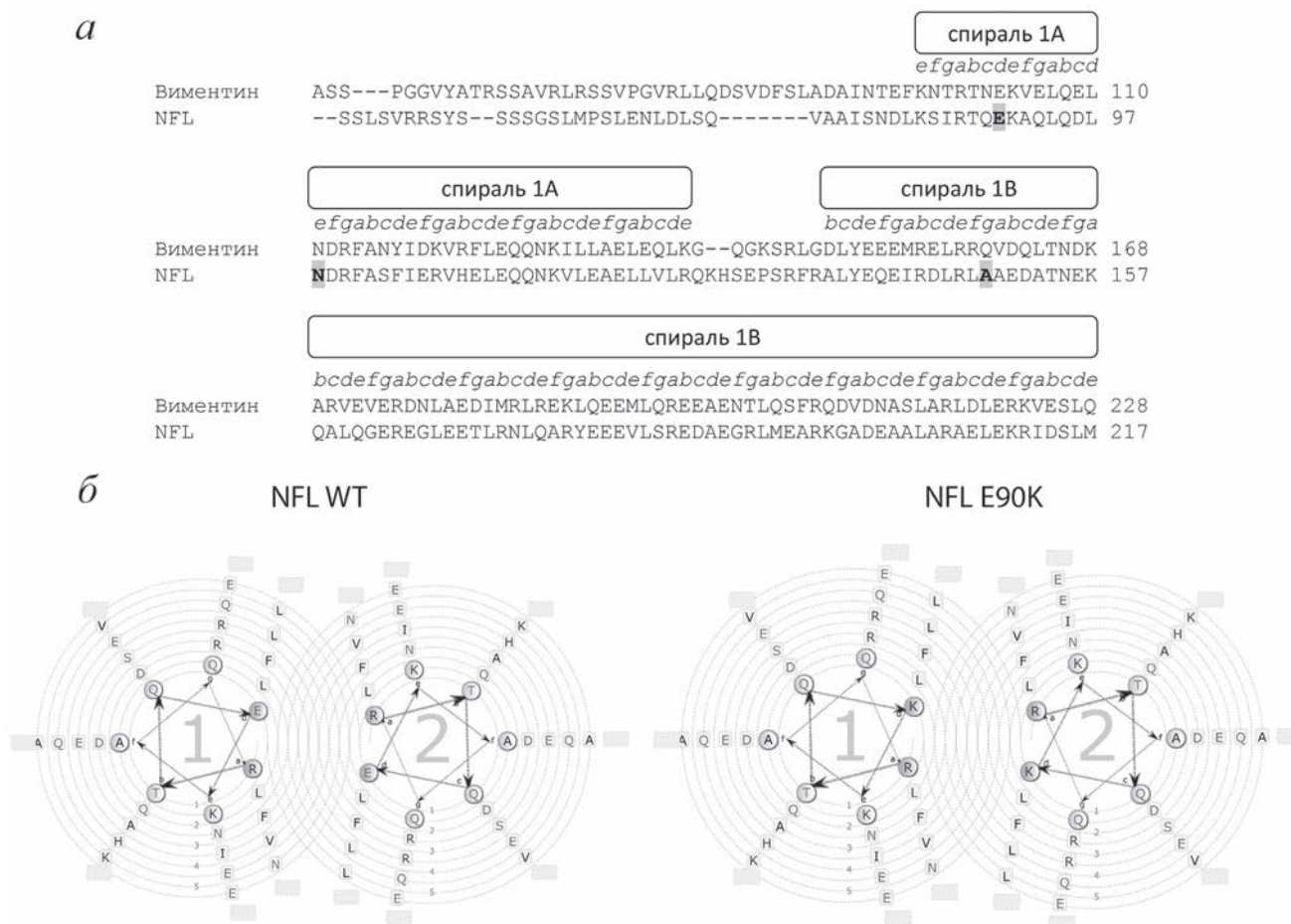


Рис. 7. Анализ положения аминокислотных остатков в гептадных повторах белка NFL. *а* — Сравнение первичных структур виментина (UniProt P08670) и белка NFL (UniProt P07196). Серым цветом обозначены аминокислотные замены в белке NFL, вызывающие развитие нейропатии Шарко–Мари–Тута. Положение аминокислот в гептадах обозначено латинскими буквами *a–g* и определено на основании статьи Chernyatina et al. [3]. *б* — Анализ положения аминокислотных остатков в гептадах NFL WT и NFL E90K в программе Waggawagga [43]. Номерами 1–5 обозначены различные гептады

спираль 1А играет важную роль в продольной полимеризации ПФ (т.е. образовании протяжённых филаментов). Для данного спирального участка белков ПФ была обнаружена самая низкая температура плавления, составляющая ~30 °С, и высказано предположение, что именно низкая термостабильность домена 1А важна для полимеризации ПФ [39–41]. Для виментина ранее была обнаружена единичная аминокислотная замена, расположенная в начале линкера 1 (K139C), из-за которой полимеризация виментина становилась зависимой от температуры. Так, белок с заменой K139C при температурах 21 °С и 37 °С одинаково быстро образовывал ULF-частицы, однако при 21 °С — не был способен образовывать протяжённые фибриллы [35]. В таком случае можно ожидать, что аминокислотные замены, которые влияют на термостабильность NFL, также могут оказывать влияние и на его способность полимеризоваться. Исследования полимеризации NFL E90K в клетках SW13 Vim⁺ показали,

что данный белок образует тонкие короткие филаменты, в отличие от белка дикого типа, который в этих же условиях образует длинные протяжённые филаменты [21]. Сопоставление этих данных литературы [21] с полученными нами результатами (рис. 6, табл. 2) указывает на то, что изменения термостабильности, индуцированные заменой E90K, происходят, по-видимому, как раз в той зоне (спиральный участок 1А, рис. 1), которая отвечает за полимеризацию NFL и образование филаментов.

Следует отметить, однако, что в случае ПФ важно также учитывать их способность к латеральной полимеризации, которая достигается за счёт антипараллельного взаимодействия димеров. Для ПФ было обнаружено несколько видов взаимодействия димеров в тетрамере: A₁₁, A₁₂ и A₂₂ [36, 38], которые отличаются взаимодействующими спиральными участками (например, в случае A₁₁ димеры взаимодействуют антипараллельно посредством спирали 1В). Несмотря на то что в зрелом филаменте ПФ

присутствуют все три вида взаимодействия, на начальных стадиях полимеризации, вплоть до ULF, взаимодействие по типу A_{11} является преобладающим [35]. Основную роль в образовании тетрамеров ПФ играет спираль 1В, однако спираль 1А и начало спирали 2 также важны для образования тетрамеров ПФ [3, 42]. Данный факт может объяснять изменения значения T_m , затрагивающие калориметрические домены 1 и 3, а также изменения энтальпии (ΔH_{cal}) всех калориметрических доменов при внесении точечных аминокислотных замен. Аминокислотные замены N98S и A149V приводили к изменениям в тепловой денатурации NFL, однако в обоих этих случаях сохранялись все четыре калориметрических домена, что, по-видимому, указывает на то, что данные замены оказывают не столь серьёзное влияние на стабилизацию суперспиралей NFL. Вероятно, это связано с тем, что данные аминокислотные остатки находятся в положениях *e* и *g* гептадных повторов, т.е. располагаются на поверхности суперспиралей. Патогенные свойства данных аминокислотных замен NFL, по-видимому, выражаются в нарушении взаимодействия между тетрамерами при образовании ULF и филаментов. В частности, для белка N98S ранее была показана агрегация в клетках SW13 Vim [21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведённых экспериментов можно заключить, что точечные аминокислотные замены в белке NFL, обнаруженные у пациентов с периферической нейропатией Шарко–Мари–Тута, не влияют на способность этого белка формировать суперспиральную структуру. Для всех исследованных мутантных белков с заменами E90K, N98S и A149V методом КД было показано наличие α -спиральной структуры. В то же время данные аминокислотные замены влияют на стабильность и тепловую денатурацию молекулы NFL, приводя

либо к уменьшению числа калориметрических доменов, выявляемых методом ДСК, как в случае замены E90K, либо к заметному изменению температуры максимума (T_m) калориметрического домена 3, либо к изменениям калориметрической энтальпии (ΔH_{cal}) доменов.

В целом, полученные данные указывают на то, что замена E90K приводит, по-видимому, к дестабилизации α -спирального участка 1А в молекуле NFL. Что касается замен N98S и A149V, то можно предположить, что они оказывают влияние не столько на структуру суперспирали, сколько на другие уровни организации молекул NFL.

Вклад авторов. А.М. Матюшенко и В.В. Нефёдова — концепция и руководство работой; Д.С. Ямпольская и В.В. Нефёдова — получение препаратов NFL; С.Ю. Клейменов — выполнение экспериментов методом ДСК; Н.А. Чеботарева — проведение экспериментов методом аналитического ультрацентрифугирования; В.В. Нефёдова и Д.И. Левицкий — написание первоначального текста статьи. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов исследования и редактировании окончательной версии статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Государственных заданий № 122041100022-3 (В.В.Н., Д.С.Я., Н.А.Ч., А.М.М., Д.И.Л.) и № 0088-2021-0009 (С.Ю.К.).

Благодарности. При проведении измерений КД использовалось оборудование Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» Федерального государственного учреждения ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Herrmann, H., and Aebi, U. (2004) Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds, *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 749–789, doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073823.
- Kornreich, M., Avinery, R., Malka-Gibor, E., Laser-Azogui, A., and Beck, R. (2015) Order and disorder in intermediate filament proteins, *FEBS Lett.*, **589** (19 Pt A), 2464–2476, doi: 10.1016/j.febslet.2015.07.024.
- Chernyatina, A. A., Nicolet, S., Aebi, U., Herrmann, H., and Strelkov, S. V. (2012) Atomic structure of the vimentin central α -helical domain and its implications for intermediate filament assembly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 13620–13625, doi: 10.1073/pnas.1206836109.

4. Eldirany, S., Ho, M., Hinbest, A. J., Lomakin, I. B., and Bunick, C. G. (2019) Human keratin 1/10-1B tetramer structures reveal a knob-pocket mechanism in intermediate filament assembly, *EMBO J.*, **38**, e100741, doi: 10.15252/embj.2018100741.
5. Strelkov, S. V., Herrmann, H., and Aebi, U., (2003) Molecular architecture of intermediate filaments, *Bioessays*, **25**, 243-251, doi: 10.1002/bies.10246.
6. Block, J., Schroeder, V., Pawelzyk, P., Willenbacher, N., and Koster, S. (2015) Physical properties of cytoplasmic intermediate filaments, *Biochim. Biophys. Acta*, **1853**, 3053-3064, doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.05.009.
7. Herrmann, H., Haner, M., Brettel, M., Ku, N. O., and Aebi, U. (1999) Characterization of distinct early assembly units of different intermediate filament proteins, *J. Mol. Biol.*, **286**, 1403-1420, doi: 10.1006/jmbi.1999.2528.
8. Brennich, M.E., Vainio, U., Wedig, T., Bauch, S., Herrmann, H., and Köster, S. (2019) Mutation-induced alterations of intra-filament subunit organization in vimentin filaments revealed by SAXS, *Soft Matter*, **15**, 1999-2008, doi: 10.1039/c8sm02281j.
9. Lee, C.-H., Kim, M.-S., Li, S., Leahy, D. J., and Coulombe, P. A. (2020) Structure-function analyses of a keratin heterotypic complex identify specific keratin regions involved in intermediate filament assembly, *Structure*, **28**, 1-8, doi: 10.1016/j.str.2020.01.002.
10. Laser-Azogui, A., Kornreich, M., Malka-Gibor, E., and Beck, R. (2015) Neurofilament assembly and function during neuronal development, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **32**, 92-101, doi: 10.1016/j.ceb.2015.01.003.
11. Veeranna, Amin, N. D., Ahn, N. G., Jaffe, H., Winters, C. A., Grant, P., and Pant, H. C. (1998) Mitogen-activated protein kinases (Erk1,2) phosphorylate Lys-Ser-Pro (KSP) repeats in neurofilament proteins NF-H and NF-M, *J. Neurosci.*, **18**, 4008-4021, doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-11-04008.1998.
12. Athlan, E. S., and Mushynski, W. E. (1997) Heterodimeric associations between neuronal intermediate filament proteins, *J. Biol. Chem.*, **272**, 31073-31078, doi: 10.1074/jbc.272.49.31073.
13. Garden, M. J., and Eagles, P. A. (1986) Chemical cross-linking analyses of ox neurofilaments, *Biochem. J.*, **234**, 587-591, doi: 10.1042/bj2340587.
14. Sasaki, T., Gotow, T., Shiozaki, M., Sakaue, F., Saito, T., Julien, J.-P., Uchiyama, Y., and Hisanaga, S.-I. (2006) Aggregate formation and phosphorylation of neurofilament-L Pro22 Charcot-Marie-Tooth disease mutants, *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 943-952, doi: 10.1093/hmg/ddl011.
15. Yuan, A., Rao, M. V., Julien, J.-P., and Nixon, R. A. (2003) Neurofilament transport *in vivo* minimally requires hetero-oligomer formation, *J. Neurosci.*, **23**, 9452-9458, doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-28-09452.2003.
16. Houlden, H., and Reilly, M. M. (2006) Molecular genetics of autosomal-dominant demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease, *Neuromolecular Med.*, **8**, 43-62, doi: 10.1385/nmm:8:1-2:43.
17. Yang, Y., Li-Qiang, Gu, Burnette, W. B., and Li, J. (2016) N98S mutation in NEFL gene is dominantly inherited with a phenotype of polyneuropathy and cerebellar atrophy, *J. Neurol. Sci.*, **365**, 46-47, doi: 10.1016/j.jns.2016.04.007.
18. Rossor, A. M., Polke, J. M., Houlden, H., and Reilly, M. M. (2013) Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease, *Nat. Rev. Neurol.*, **9**, 562-571, doi: 10.1038/nrneurol.2013.179.
19. Stone, E. J., Kolb, S. J., and Brown, A. (2021) A review and analysis of the clinical literature on Charcot-Marie-Tooth disease caused by mutations in neurofilament protein L, *Cytoskeleton*, **78**, 97-110, doi: 10.1002/cm.21676.
20. Brownlees, J., Ackerley, S., Grierson, A. J., Jacobsen, N. J. O., Shea, K., Anderton, B. H., Nigel Leigh, P., Shaw, C. E., and Miller, C. C. J. (2002) Charcot-Marie-Tooth disease neurofilament mutations disrupt neurofilament assembly and axonal transport, *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 2837-2844, doi: 10.1093/hmg/11.23.2837.
21. Perez-Olle, R., Jones, S. T., and Liem, R. K. H. (2004) Phenotypic analysis of neurofilament light gene mutations linked to Charcot-Marie-Tooth disease in cell culture models, *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 2207-2220, doi: 10.1093/hmg/ddh236.
22. Stone, E. J., Uchida, A., and Brown, A. (2019) Charcot-Marie-Tooth disease type 2E/1F mutant neurofilament proteins assemble into neurofilaments, *Cytoskeleton (Hoboken)*, **76**, 423-439, doi: 10.1002/cm.21566.
23. Adebola, A. A., Gastri, T. D., He, C.-Z., Salvatierra, L. A., Zhao, J., Brown, K., Lin, C.-S., Worman, H. J., and Liem, R. K. H. (2014) Neurofilament light polypeptide gene N98S mutation in mice leads to neurofilament network abnormalities and a Charcot-Marie-Tooth type 2E phenotype, *Hum. Mol. Genet.*, **24**, 2163-2174, doi: 10.1093/hmg/ddu736.
24. Lee, I.-B., Kim, S.-K., Chung, S.-H., Kim, H., Kwon, T. K., Min, D. S., and Chang, J.-S. (2008) The effect of rod domain A148V mutation of neurofilament light chain on filament formation, *BMB Rep.*, **41**, 868-874, doi: 10.5483/bmbrep.2008.41.12.868.
25. Jordanova, A., De Jonghe, P., Boerkoel, C. F., Takashima, H., De Vriendt, E., Ceuterick, C., Martin, J.-J., Butler, I. J., Mancias, P., Papasozomenos, S. Ch., Terespolsky, D., Potocki, L., Brown, C.W., Shy, M., Rita, D. A., Tournev, I., Kremensky, I., Lupski, J. R., and Timmerman, V. (2003) Mutations in the neurofilament light chain gene (NEFL) cause early onset severe Charcot-Marie-Tooth disease, *Brain*, **126**, 590-597, doi: 10.1093/brain/awg059.

26. Nevzorov, I. A., and Levitsky, D. I. (2011) Tropomyosin: double helix from the protein world, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 1507-1527, doi: 10.1134/S0006297911130098.
27. Nevzorov, I. A., Nikolaeva, O. P., Kainov, Y. A., Redwood, C. S., and Levitsky, D. I. (2011) Conserved noncanonical residue Gly-126 confers instability to the middle part of the tropomyosin molecule, *J. Biol. Chem.*, **286**, 15766-15772, doi: 10.1074/jbc.M110.209353.
28. Kremneva, E., Boussof, S., Nikolaeva, O., Maytum, R., Geeves, M. A., and Levitsky, D. I. (2004) Effects of two familial hypertrophic cardiomyopathy mutations in α -tropomyosin, Asp175Asn and Glu180Gly, on the thermal unfolding of actin-bound tropomyosin, *Biophys. J.*, **87**, 3922-3933, doi: 10.1529/biophysj.104.048793.
29. Matyushenko, A. M., Shchepkin, D. V., Kopylova, G. V., Popruga, K. E., Artemova, N. V., Pivovarova, A. V., Bershitsky, S. Y., and Levitsky, D. I. (2017) Structural and functional effects of cardiomyopathy-causing mutations in troponin T-binding region of cardiac tropomyosin, *Biochemistry*, **56**, 250-259, doi: 10.1021/acs.biochem.6b00994.
30. Matyushenko, A. M., Artemova, N. V., Sluchanko, N. N., and Levitsky, D. I. (2015) Effects of two stabilizing substitutions, D137L and G126R, in the middle part of α -tropomyosin on the domain structure of its molecule, *Biophys. Chem.*, **196**, 77-85, doi: 10.1016/j.bpc.2014.10.001.
31. Nevzorov, I., Redwood, C., and Levitsky, D. (2008) Stability of two β -tropomyosin isoforms: effects of mutation Arg91Gly, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **29**, 173-176, doi: 10.1007/s10974-009-9171-3.
32. Schuck, P., and Rossmanith, P. (2000) Determination of the sedimentation coefficient distribution by least-squares boundary modeling, *Biopolymers*, **54**, 328-341, doi: 10.1002/1097-0282(20001015)54:5<328::AID-BIP40>3.0.CO;2-P.
33. Freire, E., and Biltonen, R. L. (1978) Statistical mechanical deconvolution of thermal transitions in macromolecules. I. Theory and application to homogeneous systems, *Biopolymers*, **17**, 463-479, doi: 10.1002/bip.1978.360170212.
34. Nefedova, V. V., Sudnitsyna, M. V., and Gusev, N. B. (2017) Interaction of small heat shock proteins with light component of neurofilaments (NFL), *Cell Stress Chaperones*, **22**, 467-479, doi: 10.1007/s12192-016-0757-6.
35. Mücke, N., Wedig, T., Bürer, A., Marekov, L. N., Steinert, P. M., Langowski, J., Aebi, U., and Herrmann, H. (2004) Molecular and biophysical characterization of assembly-starter units of human vimentin, *J. Mol. Biol.*, **340**, 97-114, doi: 10.1016/j.jmb.2004.04.039.
36. Wickert, U., Mücke, N., Wedig, T., Müller, S. A., Aebi, U., and Herrmann, H. (2005) Characterization of the in vitro co-assembly process of the intermediate filament proteins vimentin and desmin: mixed polymers at all stages of assembly, *Eur. J. Cell Biol.*, **84**, 379-391, doi: 10.1016/j.ejcb.2005.01.004.
37. Soellner, P., Quinlan, R. A., and Franke, W. W. (1985) Identification of a distinct soluble subunit of an intermediate filament protein: tetrameric vimentin from living cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7929-7933, doi: 10.1073/pnas.82.23.7929.
38. Minin, A. A., and Moldaver, M. V. (2008) Intermediate vimentin filaments and their role in intracellular organelle distribution, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1453-1466, doi: 10.1134/s0006297908130063.
39. Meier, M., Padilla, G. P., Herrmann, H., Wedig, T., Hergt, M., Patel, T. R., Stetefeld, J., Aebi, U., and Burkhard, P. (2009) Vimentin coil 1A – a molecular switch involved in the initiation of filament elongation, *J. Mol. Biol.*, **390**, 245-261, doi: 10.1016/j.jmb.2009.04.067.
40. Vermeire, P.-J., Stalmans, G., Lilina, A. V., Fiala, J., Novak, P., Herrmann, H., and Strelkov, S. V. (2021) Molecular interactions driving intermediate filament assembly, *Cells*, **10**, 2457, doi: 10.3390/cells10092457.
41. Lilina, A. V., Leekens, S., Hashim, H. M., Vermeire, P.-J., Harvey, J. N., Strelkov, S. V. (2022) Stability profile of vimentine rod domain, *Protein Sci.*, **31**, e4505, doi: 10.1002/pro.4505.
42. Premchandrar, A., Mücke, N., Poznański, J., Wedig, T., Kaus-Drobek, M., Herrmann, H., and Dadlez, M. (2016) Structural dynamics of the vimentin coiled-coil contact regions involved in filament assembly as revealed by hydrogen-deuterium exchange, *J. Biol. Chem.*, **291**, 24931-24950, doi: 10.1074/jbc.M116.748145.
43. Simm, D., Hatje, K., and Kollmar, M. (2015) Waggawagga: comparative visualization of coiled-coil predictions and detection of stable single α -helices (SAH domains), *Bioinformatics*, **31**, 767-769, doi: 10.1093/bioinformatics/btu700.

EFFECT OF NEURODEGENERATIVE MUTATIONS IN *NEFL* GENE ON THERMAL DENATURATION OF THE NEUROFILAMENT LIGHT CHAIN PROTEIN

V. V. Nefedova^{1*}, D. S. Yampolskaya¹, S. Y. Kleymenov^{1,2}, N. A. Chebotareva¹,
A. M. Matyushenko¹, and D. I. Levitsky¹

¹ *Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia; e-mail: victoria.v.nefedova@mail.ru*

² *Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow 119334, Russia*

The effects of amino acid substitutions E90K, N98S and A149V in the light chain of neurofilaments (NFL) on the structure and thermal denaturation of the NFL molecule was investigated. By using the circular dichroism spectroscopy, it was shown that these substitutions do not lead to a changes in the α -helical structure of NFL, but they caused a noticeable effects on the stability of the molecule. We also identified calorimetric domains in the NFL structure by using the differential scanning calorimetry. It was shown that the E90K replacement lead to the disappearance of the low-temperature thermal transition (domain 1). The mutations lead to changes in the enthalpy of melting of NFL domains, as well as lead to significant changes in the melting temperatures (T_m) of some calorimetric domains. Thus, despite the fact that all these amino acid substitutions are associated with the development of Charcot–Marie–Tooth neuropathy, and two of them are even located very close to each other in the coiled-coil domain 1A, they differently effects on the structure and stability of the NFL molecule.

Keywords: intermediate filaments, neurofilaments, coiled-coil proteins, circular dichroism spectroscopy, differential scanning calorimetry