



УДК 577.2

EDN ITRYEN

<https://doi.org/10.33910/2687-1270-2024-5-3-294-306>

Малые белки теплового шока способны защитить клетки млекопитающих от кофилинопатии

Б. Ф. Щёголев^{✉1}, Е. Ю. Илатовская², Е. А. Никитина^{1,2}, Е. В. Савватеева-Попова¹

¹ Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

² Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена, 191186, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. р. Мойки, д. 48

Сведения об авторах

Борис Федорович Щёголев, SPIN-код: [1239-3324](#), Scopus AuthorID: [6701534523](#), Researcher ID: [J-6953-2018](#), ORCID: [0000-0001-5500-2837](#), e-mail: shcheg@mail.ru

Елена Юрьевна Илатовская, e-mail: latofski2497@gmail.com

Екатерина Александровна Никитина, SPIN-код: [7844-8621](#), ResearcherID: [L-5761-2014](#), Scopus AuthorID: [56603106300](#), ORCID: [0000-0003-1897-8392](#), e-mail: 21074@mail.ru

Елена Владимировна Савватеева-Попова, SPIN-код: [2559-4778](#), Scopus AuthorID: [6603078303](#), e-mail: esavvateeva@mail.ru

Для цитирования: Щёголев, Б. Ф., Илатовская, Е. Ю., Никитина, Е. А., Савватеева-Попова, Е. В. (2024) Малые белки теплового шока способны защитить клетки млекопитающих от кофилинопатии. *Интегративная физиология*, т. 5, № 3, с. 294–306. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2024-5-3-294-306> EDN ITRYEN

Получена 16 октября 2024; прошла рецензирование 6 ноября 2024; принята 8 ноября 2024.

Финансирование: Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН (№1021062411629-7-3.1.4).

Права: © Б. Ф. Щёголев, Е. Ю. Илатовская, Е. А. Никитина, Е. В. Савватеева-Попова (2024). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

Аннотация. Регуляция динамики актинового цитоскелета играет фундаментальную роль в жизнедеятельности клетки. К группе актин-связывающих белков относится семейство актин-деполимеризующий фактор (ADF) / кофилины. Взаимодействие цитоскелета клеток нервной ткани с белками — представителями семейства ADF/кофилинов может приводить к развитию нейродегенеративных заболеваний. Для млекопитающих характерна экспрессия трёх форм ADF/кофилинов: дестрин, кофилин-1 и кофилин-2. В то же время при стрессорных воздействиях в клетках млекопитающих экспрессируются малые белки теплового шока мБТШ27, для которых характерна широкая специфичность к белкам-мишеням. В предположении, что белок мБТШ27 способен связывать ряд ADF/кофилинов, с использованием программы ClusPro 2.0, был проведен докинг этих трех белков ADF/кофилинов в 24-мерный белковый комплекс мБТШ27. Показано, что сильнее всего с мБТШ27 связывается кофилин-1, затем дестрин и слабее всего — кофилин-2. При этом реконструкция F-актина — основного белка цитоскелета, ответственного за увеличение количества и размеров дендритных шипиков, а также синаптическую пластичность, модулируется именно кофилином-1. Таким образом, мБТШ27 способен осуществлять шаперонную функцию относительно ADF/кофилинов, защищая клетки от их высокой концентрации.

Ключевые слова: нейродегенеративные заболевания, цитоскелет клеток, ADF/кофилины, малый белок теплового шока, докинг белка в белок, шаперонная функция

Small heat shock proteins protect mammalian cells from cofilinopathy

B. F. Shchegolev ¹, E. Yu. Ilatovskaya², E. A. Nikitina^{1,2}, E. V. Savvateeva-Popova¹

¹ Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia
² Herzen State Pedagogical University of Russia, 48 Moika River Emb., Saint Petersburg 191186, Russia

Authors

Boris F. Shchegolev, SPIN: [1239-3324](#), Scopus Author ID: [6701534523](#), Researcher ID: [J-6953-2018](#), ORCID: [0000-0001-5500-2837](#), e-mail: shcheg@mail.ru

Elena Yu. Ilatovskaya, e-mail: latofski2497@gmail.com

Ekaterina A. Nikitina, SPIN: [7844-8621](#), ResearcherID: [L-5761-2014](#), Scopus AuthorID: [56603106300](#), ORCID: [0000-0003-1897-8392](#), e-mail: 21074@mail.ru

Elena V. Savvateeva-Popova, SPIN: [2559-4778](#), Scopus AuthorID: [6603078303](#), e-mail: esavvateeva@mail.ru

For citation: Shchegolev, B. F., Ilatovskaya, E. Yu., Nikitina, E. A., Savvateeva-Popova, E. V. (2024) Small heat shock proteins protect mammalian cells from cofilinopathy. *Integrative Physiology*, vol. 5, no. 3, pp. 294–306. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2024-5-3-294-306> EDN ITRYEN

Received 16 October 2024; reviewed 6 November 2024; accepted 8 November 2024.

Funding: The study was supported by the State funding allocated to the Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences (№1021062411629-7-3.1.4).

Copyright: © B. F. Shchegolev, E. Yu. Ilatovskaya, E. A. Nikitina, E. V. Savvateeva-Popova (2024). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under [CC BY-NC License 4.0](#).

Abstract. The regulation of actin cytoskeleton dynamics is crucial for cellular function. The actin-depolymerizing factor (ADF)/cofilin family of actin-binding proteins plays a significant role in this process. Dysregulation of the interaction between neural tissue cell cytoskeletons and ADF/cofilin proteins can contribute to the development of neurodegenerative diseases. Mammals typically express three forms of ADF/cofilins: destrin, cofilin-1, and cofilin-2. Under stress conditions, small heat shock proteins (sHsp27), known for their broad specificity to target proteins, are upregulated in mammalian cells. We hypothesized that sHsp27 proteins may bind ADF/cofilins, and used the ClusPro 2.0 tool for docking simulations of these three ADF/cofilins into a 24-dimensional sHsp27 protein complex. Our results revealed that cofilin-1 formed the strongest interaction with sHsp27, followed by destrin and cofilin-2. Notably, cofilin-1 modulates the remodeling of F-actin, a key cytoskeletal protein involved in dendritic spine formation and synaptic plasticity. Thus, sHsp27 may serve as a chaperone for ADF/cofilins, protecting cells from their harmful accumulation.

Keywords: neurodegenerative diseases, cell cytoskeleton, ADF/cofilins, small heat shock protein, protein-protein docking, chaperone function

Введение

Важнейшую роль в развитии нейродегенеративных заболеваний (НДЗ) играют нарушения в работе цитоскелета клеток нервной ткани, вызывающие, в том числе, и снижение синаптической пластичности (Wang et al. 2020). К подобным нарушениям может приводить, например, взаимодействие с белками — представителями семейства актин-деполимеризующего фактора (ADF) / кофилинов, активно участвующих в реорганизации актинового цитоскелета (Maciver, Hussey 2002; Tanaka et al. 2018; Wonga, Sept 2011). В зависимости от концентрации ADF/кофилинов возможно два варианта реорганизации активного цитоскелета: при низкой концентрации ADF/кофилинов они способствуют разборке F-актина посредством его диссоциации до мономерного G-актина (Kovaleva et al. 2019), тогда как

высокая концентрация белков ADF/кофилинов способствует нуклеации и полимеризации актина (Wang et al. 2020).

Обнаружено, что при сверхэкспрессии или гиперактивации ADF/кофилинов, а также при хроническом или остром стрессе, в нейритах нейронов образуются особые структуры — кофилин-актиновые палочки, нарушающие аксоплазматический транспорт и синаптические функции. Образование таких палочек приводит к потере дендритных шипиков, а также к ухудшению транспортной функции аксоплазмы, что в дальнейшем может приводить к развитию НДЗ (Wang et al. 2020).

Следует отметить, что в нормальных условиях в различных клетках, в том числе и в клетках нервной ткани, синтезируется большое количество разных белков, включая белки теплового шока (БТШ). Белки теплового шока

различными способами участвуют в фолдинге полипептидных цепочек, как в нормальных, так и в экстремальных условиях, а также способствуют ренатурации частично денатурированных или элиминации полностью денатурированных белков (Wang et al. 2020). Эти белки обнаружены у разных организмов от бактерий до млекопитающих, в том числе и у человека, и относятся к группе наиболее консервативных белков. Ранее нами при исследовании роли больших белков теплового шока при НДЗ были предприняты расчеты белков БТШ70, которые активируются в клетках в ответ на различные формы стресса (Zhuravlev et al. 2022). Оказалось, что эти АТФ-связывающие белки, осуществляющие шаперонную функцию, способны конкурентно связывать 3-гидроксикинуридин (3-НОК), который в высоких концентрациях является критическим фактором развития многих НДЗ. При этом изменяется активность самого БТШ70, связанная с его участием в процессах стресса, обучения и формирования кратковременной памяти. В то же время эффективное связывание 3-НОК белком теплового шока БТШ70 является новым механизмом защиты клеток от высокой концентрации 3-НОК.

В нашей дальнейшей работе мы обратились еще к одной группе белков теплового шока — малым белкам теплового шока (мБТШ), которые также активируются при действии стресса. Малые белки теплового шока с молекулярными массами в интервале 12–43 кДа представляют отдельную группу среди белков теплового шока. Эти белки были выделены из архей, бактерий, растений и животных (MacRae 2000). Характерной чертой таких белков является независимость их деятельности от АТФ (в них отсутствует сайт связывания с АТФ), что позволяет этим белкам успешно функционировать без затраты собственных энергетических запасов клетки. Для большинства малых белков теплового шока характерна широкая специфичность к белкам-мишеням. Такие мБТШ образуют первую линию защиты от различных протеотоксических стрессов, связанных с неправильным свертыванием белка (Shatov et al. 2023).

Малый белок теплового шока мБТШ27 является повсеместно экспрессируемым молекулярным шапероном в клетках млекопитающих, играющим важную роль во многих физиологических процессах (Hao et al. 2007; Singh et al. 2017). Являясь АТФ-независимым, белок мБТШ27 защищает субстраты от необратимой агрегации и удерживает их в свернутом состоянии для последующей разборки. Отмечено, что мБТШ27 взаимодействует напрямую с F-актином (Gracef-

fa 2011; Gusev et al. 2002; Muranova et al. 2022). Кроме того, показано, что при развитии нейродегенеративных заболеваний наблюдается повышенный уровень мБТШ27, что явно неслучайно (Westerheide, Morimoto 2005). Наряду с этим мутации в гене мБТШ27 приводят к развитию нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Шарко-Мари-Тута и дистальная наследственная моторная невропатия (Holguin et al. 2022).

Белки мБТШ27 образуют димеры, которые собираются в большие 16–32 олигомерные комплексы (Gusev et al. 2002; Panasenko et al. 2003). В работе МакРей (MacRae 2000) подчеркивается, что олигомеризация является необходимым условием для функционирования этого белка в качестве молекулярного шаперона. Оказывается, что мБТШ, хотя и способны связывать широкий спектр клеточных белков, предпочитают защищать определенные классы функциональных белков, таких как белки, связанные с трансляцией, и метаболические ферменты, что вполне может объяснить, почему они способны повышать устойчивость клеток-хозяев к различным видам стресса.

В работе Мурановой с соавторами (Muranova et al. 2022) отмечено, что малые белки теплового шока, возможно, обладают способностью к связыванию с некоторыми актин-связывающими белками. Именно к этой категории белков и относятся исследуемые нами ADF/кофилины. Основываясь на данном предположении, мы выдвинули гипотезу о том, что белок мБТШ27, являющийся одним из наиболее распространенных и повсеместно экспрессируемых малых белков теплового шока человека (Hayashi et al. 2021), может оказаться способным к связыванию ряда ADF/кофилинов, тем самым регулируя концентрацию кофилинов в клетках и образование актин-кофилиновых палочек. Именно поэтому проблема уменьшения концентрации ADF/кофилинов в клетках за счет возможных разнообразных ресурсов самой клетки становится чрезвычайно актуальной. Подобная постановка задачи в научной литературе до этого вообще не рассматривалась.

Материалы и методы

В качестве модели малого белка теплового шока, потенциально способного к связыванию ADF/кофилинов, была выбрана модель сферического 24-мерного комплекса мБТШ27, состоящего из 12 димеров мБТШ27. Структура, свойства, а также шаперонная активность малых белков теплового шока, в том числе

и мБТШ27 подробно разобраны в работе Панасенко с соавторами (Panasenکو et al. 2003). В свою очередь в работе Наппи с соавторами (Nappi et al. 2020) отмечено, что именно 24-мерный олигомер мБТШ27 способен выполнять шаперонную или шапероноподобную функции, взаимодействуя с неправильно свернутыми или, как в нашем случае, специфическими белками.

Структура 24-мерного комплекса человека мБТШ27 (идентификатор PDB — 6DV5) представлена на рисунке 1, здесь и далее рисунки сделаны в программе РумОЛ (РумОЛ... 2024). Структура была получена в 2019 г. методом дифракции рентгеновских лучей с разрешением 3,6 Å. В растворе белки мБТШ27 существуют в виде крупных гетерогенных олигомеров с порами со средней массой 500 кДа. Масса их мономерной субъединицы составляет 22,8 кДа.

Как и у всех малых белков теплового шока, аминокислотная последовательность мБТШ27 состоит из трех областей (Shatov et al. 2023): N-концевой области (NTR), домена α -кристаллина (ACD) и C-концевой области (CTR). Область NTR имеет различную длину, в основном она не структурирована и активно участвует в образовании крупных мБТШ-олигомеров. В свою очередь, центральный ACD домен, высоко кон-

сервативен и хорошо структурирован. Обычно он строится из 80–100 аминокислотных остатков и содержит шесть-семь β -складок, расположенных в виде иммуноглобулиновой укладки, которая, в свою очередь, складывается в два β -листа, каждый из которых образован тремя-четырьмя β -нитями.

Основным строительным блоком интактного мБТШ-олигомера является димер. Не структурированная CTR область обеспечивает растворимость этого гидрофобного белка и обеспечивает взаимодействия между отдельными субъединицами (Shatov et al. 2023).

Существуют 5 форм кофилина, встречающихся в различных организмах эукариот: кофилин-1, кофилин-2, дестрин, депактин и актофорин (Maciver, Hussey 2002). Для млекопитающих в основном характерна экспрессия трех форм ADF-кофилинов: дестрин (актин-деполимеризующий фактор), кофилин-1 (немышечный) и кофилин-2 (мышечный) (Gusev et al. 2002; Wang et al. 2020).

В качестве материалов для задания входных данных наших расчетов по докингу трех упомянутых выше белков-кофилинов были использованы файлы из электронной базы данных Protein Data Bank (PDB) (Berman et al. 2000; Structure-guided discovery... 2024).

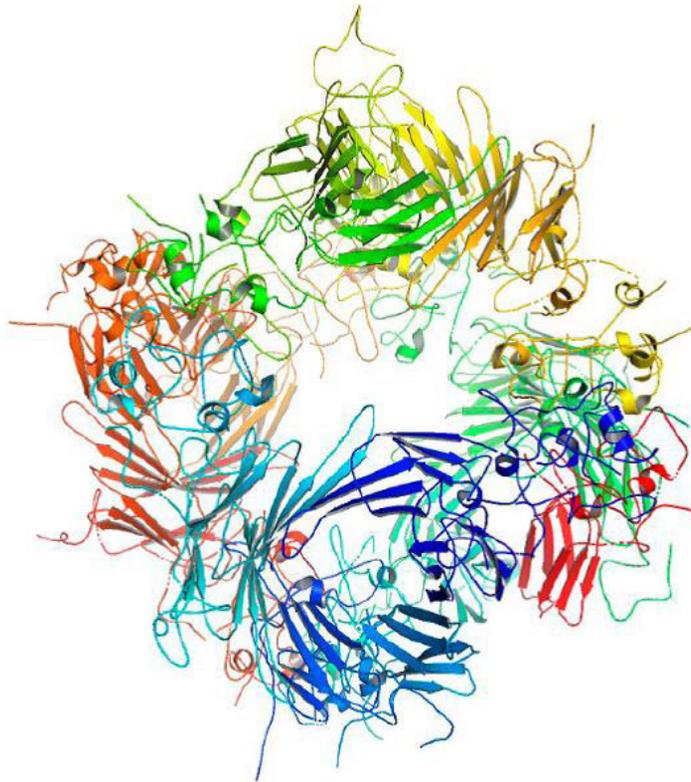


Рис. 1. Олигомерный комплекс 24-мерного мБТШ27 человека

Fig. 1. Oligomeric complex of 24-dimensional human sHsp27

Структура кофилина-1 (идентификатор PDB — 4ВЕХ) представляет собой мономер точечного мутанта С147А кофилина-1 человека (рис. 2), была получена в 2013 г. методом дифракции рентгеновских лучей с разрешением 2,80 Å (Klejnot et al. 2013).

Структура кофилина-2 человека (рис. 3) (идентификатор PDB — 7M0G) представляет собой мономер кофилина-2b и была получена методом ядерного магнитного резонанса в твердом состоянии в 2022 г. (Kraus et al. 2022).

Структура дестрина (идентификатор PDB — 1АК6) представляет собой мономер дестрина

человека (рис. 4); была получена методом ядерного магнитного резонанса в растворе в 1996 г. (Hatanaka et al. 1996).

Для каждого из приведенных белков ADF/кофилинов характерен следующий тип строения: наличие домена ADF-H с несколькими дополнительными аминокислотными остатками, в их числе метионин на N-конце полипептидной цепи и около десяти аминокислотных остатков на C-конце (Shatov et al. 2023). Структуры кофилина-1 и кофилина-2 в значительной мере похожи, тогда как структура дестрина несколько отличается.

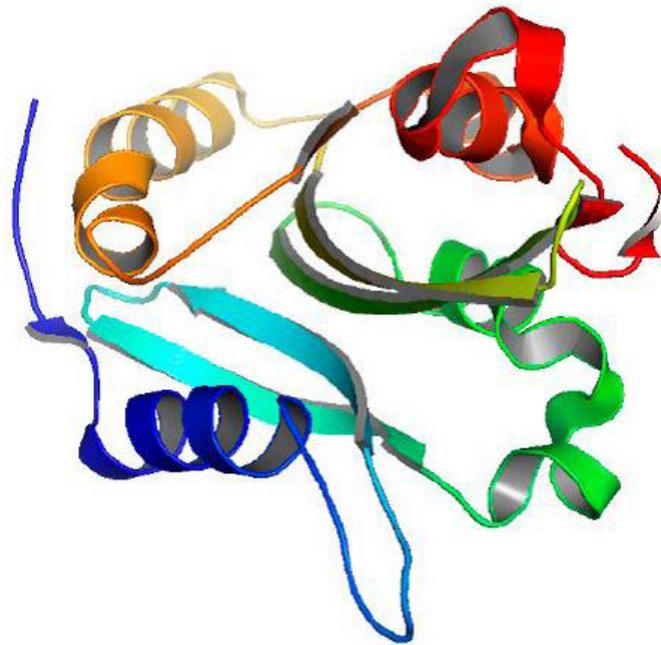


Рис. 2. Точечный мутант С147А мономера кофилина-1 человека

Fig. 2. Human cofilin-1 C147A monomer point mutant

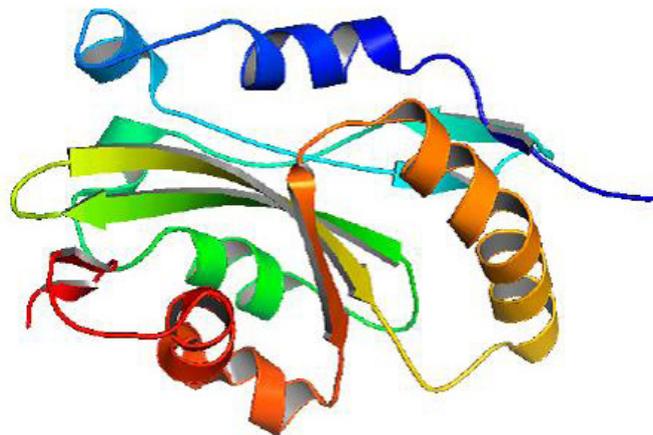


Рис. 3. Мономер кофилина-2b человека

Fig. 3. Human cofilin-2b monomer

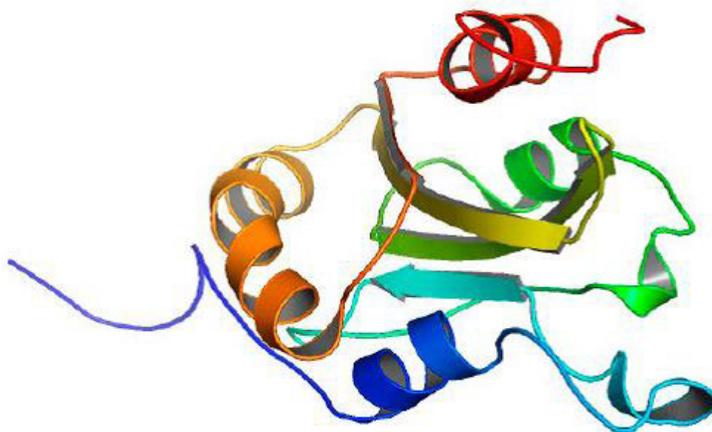


Рис. 4. Мономер дестрина человека

Fig. 4. Human destrin monomer

Докинг рассматриваемых белков ADF/кофилинов в белок 24-мерного комплекса мБТШ27 человека проводили с использованием общедоступного комплекса программ ClusPro 2.0 (ClusPro... 2024), реализованного на сервере Бостонского университета. Для ввода входных данных требуется только два файла в формате Protein Data Bank, представляющих структуры выбранного ADF/кофилина и мБТШ27. При расчетах использовали опцию Метод уравнивания. Уникальная часть программы по высокоскоростному расчету на основе преобразований Фурье была создана сотрудником МФТИ А. М. Казённовым совместно с группой The Vajda Lab (Kozakov et al. 2010; 2017).

Результаты и обсуждение

В рамках расчетов с помощью комплекса программ ClusPro 2.0 для модификации поиска оптимальной конформации конечных кластеров была применена скоринг-функция с большим вкладом электростатических взаимодействий. Кроме того, из шести возможных энергетических функций, следуя рекомендациям разработчиков программы, была выбрана электростатическая функция.

$$E = 0,40E_{\text{rep}} - 0,40E_{\text{att}} + 1200E_{\text{elec}} + 1,00E_{\text{DARS}},$$

где E_{rep} и E_{att} — вклады отталкивания и притяжения в энергию Ван-дер-Ваальсова взаимодействия, E_{elec} — энергия электростатического взаимодействия; E_{DARS} — вклады в энергию парного, структурно зависимого взаимодействия, описывающие десольватацию, т. е. изменение свободной энергии за счет удаления молекул воды из границы раздела двух сред.

В результате были получены следующие оценочные рейтинговые баллы:

- для кофилина-1 -1207,2
- для дестрина -1143,6
- для кофилина-2 -971,6

К сожалению, полученные оценки не могут рассматриваться как мера сродства к связыванию. Для оценки связывания необходимо привлечь полученные в расчетах данные о количестве цепей между белками, участвующими в связывании, а также количестве водородных связей и солевых мостиков в них.

Все полученные результаты записываются в виде PDB-файла с дальнейшей расшифровкой с помощью программы PDBPlus (PyMOL3... 2024; Structure-guided discovery... 2024). Результаты расчетов, визуализированные на рисунке 5, показывают, что при взаимодействии мБТШ27 с кофилином-1 в связывании принимают участие только 8 из 24 цепей.

На рисунке 6 визуализирован результат докинга дестрина в мБТШ27, в связывании с дестрином принимают участие 10 из 24 цепей мБТШ27.

На рисунке 7 визуализированы результаты докинга кофилина-2 в мБТШ27. Оказалось, что в связывании участвуют 9 из 24 цепей мБТШ27.

Данные проведенных расчетов по оптимизации пространственного расположения трех исследуемых ADF/кофилинов внутри малого белка теплового шока мБТШ27 показывают, что самое большое количество солевых мостиков (по семь) образуют кофилин-1 и кофилин-2, тогда как дестрин образует всего лишь четыре таких мостика. В свою очередь самое большое количество значимых по энергетическим вкладом водородных связей с мБТШ27 образует кофилин-1, их 21; дестрин образует меньшее

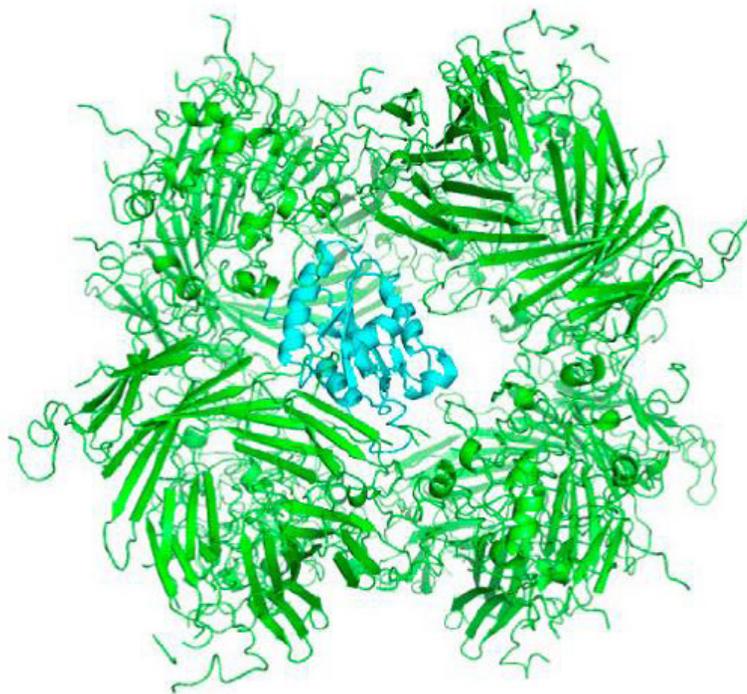


Рис. 5. Расположение кофилина-1 внутри мБТШ27. Белки изображены в виде вторичных структур. Зеленым цветом обозначены цепи мБТШ27, голубым — кофилина-1

Fig. 5. Localization of cofilin-1 within sHsp27. Proteins are depicted as secondary structures, with sHsp27 chains colored green and cofilin-1 chains colored blue.

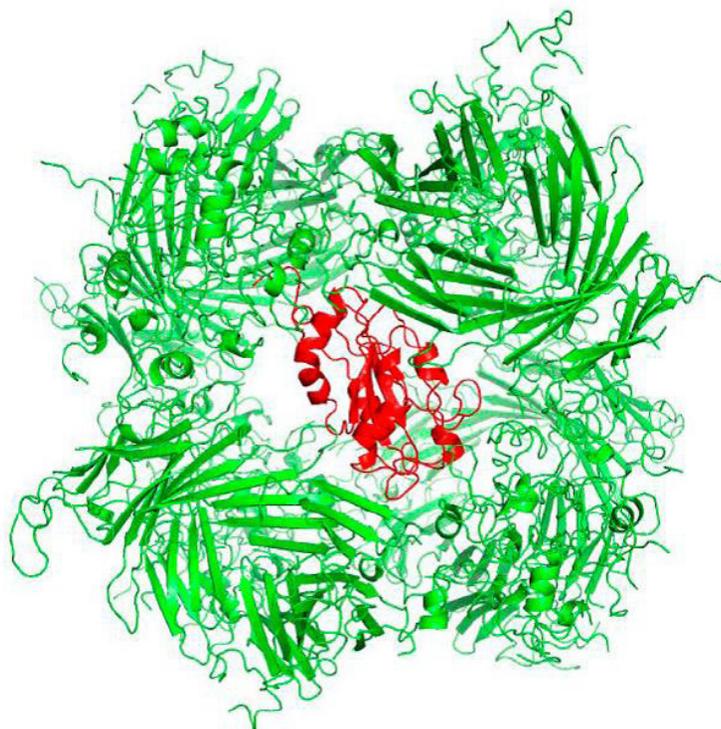


Рис. 6. Расположение дестрина внутри мБТШ27. Белки изображены в виде вторичных структур. Зеленым цветом обозначены цепи мБТШ27, красным — дестрина

Fig. 6. Localization of destrin within sHsp27. Proteins are depicted as secondary structures, with sHsp27 chains colored green and destrin colored red.

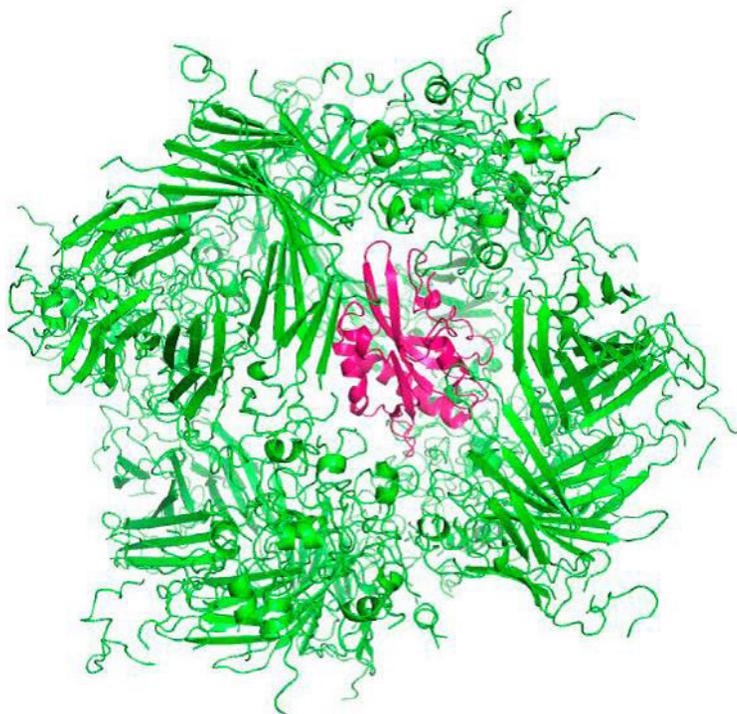


Рис. 7. Расположение кофилина-2 внутри мБТШ27. Белки изображены в виде вторичных структур. Зеленым цветом обозначены цепи мБТШ27, розовым — кофилина-2

Fig. 7. Localization of cofilin-2 within sHsp27. Proteins are depicted as secondary structures, with sHsp27 chains colored green and cofilin-2 chains colored pink

количество таких водородных связей — 16 и всего лишь 9 таких водородных связей образует кофилин-2. По-видимому, решающую роль в связывании играет образование водородных связей между молекулярными фрагментами ADF/кофилинов и фрагментами структуры, участвующими в связывании со стороны мБТШ27.

Приведем энергетические оценки возможного связывания ADF/кофилинов внутри мБТШ27 с учетом того, что образованные межбелковые водородные связи являются слабыми, этим

связям соответствуют межатомные расстояния порядка 3Å, а их энергия составляет приблизительно 1,5 ккал/моль на одну связь (Sheu et al. 2003). Для солевых мостиков в белках характерны соответствующие межатомные расстояния порядка 4Å и энергии связывания приблизительно 3 ккал/моль на одну связь (Wimley et al. 1996). В таблице 1 приведены оценки энергий связывания ADF/кофилинов с мБТШ27 с учетом всех слабых водородных связей и солевых мостиков, а также суммарные оценки связывания.

Табл. 1. Оценка энергии связывания ADF/кофилинов с мБТШ27 в ккал/моль

ADF/кофилин	Число водородных связей	Энергия водородных связей ккал/моль	Число солевых мостиков	Энергия солевых мостиков ккал/моль	Суммарная энергия связывания ккал/моль
Кофилин-1	21	31,5	7	21	52,5
Кофилин-2	9	13,5	7	21	34,5
Дестрин	16	24	4	12	36

Table 1. Evaluation of binding energy between ADF/cofilins and sHSP27, kcal/mol

ADF/cofilin	Number of hydrogen bonds	Hydrogen bond energy (kcal/mol)	Number of salt bridges	Energy of salt bridges (kcal/mol)	Total binding energy (kcal/mol)
Cofilin-1	21	31.5	7	21	52.5
Cofilin-2	9	13.5	7	21	34.5
Dextrin	16	24	4	12	36

Приведенные суммарные оценки энергий связывания ADF/кофилинов внутри мБТШ27 показывают, что сильнее всего с мБТШ27 связывается кофилин-1, затем следует дестрин и слабее всего связывается кофилин-2.

Согласно современным представлениям, биохимические каскады, активируемые в ответ на стрессорные воздействия, напрямую взаимосвязаны с некоторыми когнитивными функциями, такими как обучение и формирование памяти (Medvedeva et al. 2022). По-видимому, существует единый адаптационный механизм, лежащий в основе формирования стрессорной реакции и обучения, который позволяет организмам приспособиться к окружающей среде обитания. В настоящее время это положение уже подтверждено экспериментально. Данные работы О. Г. Зацепиной с соавторами (Zatsepina et al. 2021) убедительно демонстрируют роль белка теплового шока БТШ70 в формировании памяти, помимо его важной роли в фолдинге и деградации белков. Показано, что транскрипционный фактор, который индуцирует экспрессию БТШ70 и других генов теплового шока, играет центральную роль в синаптической пластичности и консолидации памяти. Все это приводит к выводу о совместном эволюционировании механизмов стрессорной реакции и формирования памяти.

Относительно влияния мБТШ27 на когнитивные процессы известно немного. Наиболее важная функция мБТШ27 основана на его способности связывать ненативные белки и ингибировать агрегацию неправильно свернутых белков, поддерживая их в состоянии, способном к рефолдингу. Кроме того, он обладает антиапоптотической и антиоксидантной активностью. Помимо этого, с привлечением модели болезни Альцгеймера (БА) на мышах показано, что сверхэкспрессия мБТШ27 может облегчать некоторые симптомы БА, в частности, восстанавливать способность к пространственному обучению, нормализовать долговременную потенцию (long term potentiation, LTP) и уменьшать количество амилоидных бляшек в мозге (Tóth et al. 2013). В этой связи результаты наших расчетов — еще один шаг в понимании и разработке возможных путей терапевтических воздействий при лечении НДЗ, в том числе БА.

В XXI веке нейродегенеративные заболевания, характеризующиеся прогрессирующей деменцией, часто называют кофилинопатиями. Это обусловлено тем, что гиперактивация кофилина сопровождается образованием кофилин-актиновых комплексов, которые накапливаются в аксонах и дендритах нейронов, блокируя везикулярный транспорт, что является причиной атрофии нейритов. Нарушение как антероград-

ного, так и ретроградного транспорта в нейронах затрудняет процесс консолидации стимулов при обучении и формировании памяти. Ключевую роль в регуляции актинового каскада путем фосфорилирования кофилина по серину-3, ослабляя его актин-связывающую, расщепляющую и деполимеризующую активность, играет LIMK1 (Nikitina et al. 2024). Ранее было показано, что мутационное повреждение гена LIMK1 у мутанта дрозофилы *agn^{ts3}* нарушает все типы памяти (Kaminskaya et al. 2012; 2015; Medvedeva et al. 2008; Nikitina et al. 2012; 2014a; 2014b; Zaslomaeva et al. 2021).

В этой связи интересны данные о регулирующем влиянии мБТШ27 на динамику актиновых филаментов (Doshi et al. 2009). Показано, что мБТШ27 и актин колокализуются в клетках, кроме того наличие мБТШ27 важно для обеспечения подвижности клеток. Белок мБТШ27 ингибирует полимеризацию актина *in vitro*, связываясь с F-актином (Graceffa 2011). Ключевым регулятором динамики актина является кофилин. При низких концентрациях кофилин способствует разборке F-актина путем увеличения диссоциации до мономерного G-актина. F-актин также осуществляет контроль изменения морфологии шипиков. Инактивация кофилина способствует снижению обучения и вызывает тяжелые поведенческие аномалии (Nikitina et al. 2024). Экспериментально показано связывание мБТШ27 с актином, а также возможное связывание с кофилином, следующее из наших расчетов, может быть одним из возможных механизмов нейропротекции.

Проведенный недавно исследователями из Гонконга полногеномный анализ (Chine et al. 2019) показал, что мБТШ27 является частью транскрипционной сети, индуцируемой повреждением аксонов, в которую вовлечены гены, участвующие в адаптивных реакциях нейронов, особенно в регенерации аксонов. Обнаружено, что мБТШ27 способен защищать нейроны от нейротоксичности, вызванной химиотерапевтическими агентами, *in vivo*, включая дегенерацию афферентных нервных волокон, демиелинизацию, набухание митохондрий, апоптоз и восстановление потенциала действия чувствительных нервов. Отдельно отмечено участие мБТШ27 в нейропротекции против ишемического повреждения (Stetler et al. 2012). Чрезвычайно интересные результаты получены на дрозофиле, у которой нейрональная экспрессия мБТШ27 увеличивает продолжительность жизни и повышает устойчивость к окислительному стрессу, а также ослабляет токсичность, вызванную полиглутамином (Liao et al. 2008). Кроме того, показана стабилизация дендритных шипиков в нейронах, конститутивно

экспрессирующих мБТШ27 (Ruscher et al. 2011). Эти данные дополнительно свидетельствуют о вовлеченности мБТШ27 в обеспечение синаптической пластичности.

Заключение

Таким образом, малый белок теплового шока мБТШ27 в виде 24-мерного олигомера, в предположении, что именно это и есть его функциональная нативная структура, способен связывать все три изучаемых белка семейства ADF-кофилинов, однако связывает он их с различной энергией. Вслед за связыванием мБТШ27 способен осуществлять шаперонную функцию в отношении рассматриваемых белков семейства ADF/кофилинов, структура которых может несколько отличаться от структуры правильно свернутых белков, например, за счет их частичной денатурации из-за некоторого повышения температуры. Во всяком случае мы предполагаем продолжить наши расчеты со связыванием таких ADF/кофилинов. Стоит отметить, что наши результаты не исключают возможность связывания белков семейства ADF/кофилинов с белком мБТШ27, который может находиться и в другом виде (например, в виде 26–32 олигомерных комплексов), что также будет предметом наших дальнейших расчетов.

Реконструкция F-актина — основного белка цитоскелета, ответственного за увеличение размеров дендритных шипиков, модулируется именно кофилином-1 (Wang et al. 2020), который, по данным наших расчетов, связывается сильнее всего с мБТШ27, предположительно защищая на первом этапе нервные клетки от уменьшения количества и размеров дендритных шипиков, а, следовательно, и от нарушений синаптической пластичности. Следует напомнить, что именно дендритные шипики являются первичными участками приема информации, а также клеточными субстратами для осуществления синаптической передачи (Wang et al. 2020).

Необходимо отметить, что, хотя малые белки теплового шока не содержат сайт связывания АТФ, не стоит исключать, что для образования еще более прочных связей с белками представителями семейства ADF-кофилины белки мБТШ27 могут нуждаться в предварительной активации путем каких-либо структурных изменений, вызванных, например, повышением температуры. Для возможного объяснения такого эффекта следует обратиться к структуре мБТШ27. Образование димеров, а затем 24-мерных олигомерных комплексов такого белка, во многом происходит за счет водородных связей их β -складок. Некоторое повышение

температуры приводит к разрыву части водородных связей, в том числе и в β -складках. В свою очередь такие разорванные водородные связи способны образовывать дополнительные водородные связи с соответствующими фрагментами ADF-белков-кофилинов, увеличивая энергию их связывания внутри мБТШ27. С другой стороны, фосфорилирование мБТШ27 приводит к резкому снижению его активности (Hao et al. 2007), что объясняется, на наш взгляд, как снижением возможностей к связыванию внутри мБТШ27 за счет уже образованных водородных связей с фосфорными остатками, так и за счет уменьшения свободного пространства, доступного для связывания других белков.

Для подтверждения обнаруженного эффекта связывания ряда ADF/кофилинов с мБТШ27 в клетке и того, что данное взаимодействие может оказывать влияние на НДЗ, а также возможной шаперонной функции мБТШ27 необходимо продолжение данных исследований в формате *in vitro* и *in vivo*.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest, either existing or potential.

Вклад авторов

а. Щеголев Борис Федорович — планирование эксперимента, обсуждение результатов, написание статьи;

б. Илатовская Елена Юрьевна — постановка эксперимента, обработка данных, обсуждение результатов;

в. Никитина Екатерина Александровна — планирование эксперимента, обсуждение результатов, написание статьи;

г. Савватеева-Попова Елена Владимировна — обсуждение результатов.

Author Contributions

a. Boris F. Shchegolev — experiment planning, results discussion, manuscript writing;

b. Elena Yu. Ilatovskaya — experiment setting, data processing, results discussion;

c. Ekaterina A. Nikitina — experiment planning, results discussion, manuscript writing;

d. Elena V. Savvateeva-Popova — results discussion.

References

- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z. et al. (2000) The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, vol. 28, no. 1, pp. 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235> (In English)
- Chine, V. B., Au, N. P. B., Kumar, G., Ma, C. H. E. (2019) Targeting axon integrity to prevent chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Molecular Neurobiology*, vol. 56, no. 5, pp. 3244–3259. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1301-8> (In English)
- ClusPro 2.0. (2024) [Online]. Available at: <https://cluspro.bu.edu/> (accessed 15.10.2024). (In English)
- Doshi, B., Hightower, L. E., Lee, J. (2009) The role of Hsp27 and actin in the regulation of movement in human cancer cells responding to heat shock. *Cell Stress and Chaperones*, vol. 14, no. 5, pp. 445–457. <https://doi.org/10.1007/s12192-008-0098-1> (In English)
- Graceffa, P. (2011) Hsp27-actin interaction. *Biochemistry Research International*, vol. 2011, no. 1, article 901572. <https://doi.org/10.1155/2011/901572> (In English)
- Gusev, N. B., Bogachova, N. V., Marston, S. B. (2002) Structure and properties of small heat shock proteins (sHsp) and their interaction with cytoskeleton proteins. *Biochemistry (Moscow)*, vol. 67, no. 5, pp. 511–519. <https://doi.org/10.1023/a:1015549725819> (In English)
- Hao, X., Zhang, S., Timakov, B., Zhang, P. (2007) The Hsp27 gene is not required for Drosophila development but its activity is associated with starvation resistance. *Cell Stress & Chaperones*, vol. 12, no. 4, pp. 364–372. <https://doi.org/10.1379/csc-308.1> (In English)
- Hatanaka, H., Ogura, K., Moriyama, K. et al. (1996) Tertiary structure of destrin and structural similarity between two actin-regulating protein families. *Cell*, vol. 85, no. 7, pp. 1047–1055. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81305-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81305-7) (In English)
- Hayashi, J., Ton, J., Negi, S. et al. (2021) The effect of oxidized dopamine on the structure and molecular chaperone function of the small heat-shock proteins, α B-crystallin and Hsp27. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 7, article 3700. <https://doi.org/10.3390/ijms22073700> (In English)
- Holguin, B. A., Hildenbrand, Z. L., Bernal, R. A. (2022) Insights into the role of heat shock protein 27 in the development of neurodegeneration. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, vol. 15, article 868089. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.868089> (In English)
- Kaminskaya, A. N., Nikitina, E. A., Medvedeva, A. V. et al. (2015) The influence of gene limk1 polymorphism on learning and memory and formation, pCREB distribution and aggregates formation in neuromuscular junctions of Drosophila melanogaster. *Russian Journal of Genetics*, vol. 51, no. 6, pp. 582–590. <https://doi.org/10.1134/S1022795415060071> (In English)
- Kaminskaya, A. N., Nikitina, E. A., Payalina, T. L. et al. (2012) Effect of the LIM kinase 1 isoform ratio on Drosophila melanogaster courtship behavior: A complex approach. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, vol. 2, no. 5, pp. 367–377. <https://doi.org/10.1134/S2079059712050024> (In English)
- Klejnot, M., Gabrielsen, M., Cameron, J. et al. (2013) Analysis of the human cofilin 1 structure reveals conformational changes required for actin binding. *Acta Crystallographica Section D*, vol. 69, no. 9, pp. 1780–1788. <https://doi.org/10.1107/S0907444913014418> (In English)
- Kovaleva, T. F., Maksimova, N. S., Zhukov, I. Y. et al. (2019) Cofilin: Molecular and cellular functions and its role in the functioning of the nervous system. *Neurochemical Journal*, vol. 13, no. 1, pp. 11–19. <https://doi.org/10.1134/S1819712419010124> (In English)
- Kozakov, D., Hall, D. R., Beglov, D. et al. (2010) Achieving reliability and high accuracy in automated protein docking: ClusPro, PIPER, SDU, and stability analysis in CAPRI rounds 13–19. *Proteins*, vol. 78, no. 15, pp. 3124–3130. <https://doi.org/10.1002/prot.22835> (In English)
- Kozakov, D., Hall, D. R., Xiab, B. et al. (2017) The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature Protocols*, vol. 12, no. 2, pp. 255–278. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169> (In English)
- Kraus, J., Russell, R. W., Kudryashova, E. et al. (2022) Magic angle spinning NMR structure of human cofilin-2 assembled on actin filaments reveals isoform-specific conformation and binding mode. *Nature Communications*, vol. 13, no. 1, article 2114. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29595-9> (In English)
- Liao, P. C., Lin, H. Y., Yuh, C. H. et al. (2008) The effect of neuronal expression of heat shock proteins 26 and 27 on lifespan, neurodegeneration, and apoptosis in Drosophila. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 376, no. 4, pp. 637–641. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.161> (In English)
- Maciver, S. K., Hussey, P. J. (2002) The ADF/cofilin family: Actin-remodeling proteins. *Genome Biology*, vol. 3, no. 5, article reviews3007. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-5-reviews3007> (In English)
- MacRae, T. H. (2000) Structure and function of small heat shock/ α -crystallin proteins: Established concepts and emerging ideas. *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 57, pp. 899–913. <https://doi.org/10.1007/pl00000733> (In English)
- Medvedeva, A. V., Molotkov, D. A., Nikitina, E. A. et al. (2008) Systemic regulation of genetic and cytogenetic processes by a signal cascade of actin remodeling: Locus agnostic in Drosophila. *Russian Journal of Genetics*, vol. 44, no. 6, pp. 669–681. <https://doi.org/10.1134/S1022795408060069> (In English)

- Medvedeva, A. V., Rebrova, A. V., Zalomaeva, E. S. et al. (2022) Role of LIM kinase 1 in dopaminergic and serotonergic neurons in genome stability, learning and memory during stress response to weakening of Earth's magnetic field in *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, vol. 58, no. 1, pp. 35–44. <https://doi.org/10.1134/S0022093022010033> (In English)
- Muranova, L. K., Shatov, V. M., Gusev, N. B. (2022) Role of small heat shock proteins in the remodeling of actin microfilaments. *Biochemistry (Moscow)*, vol. 87, no. 8, pp. 800–811. <https://doi.org/10.1134/S0006297922080119> (In English)
- Nappi, L., Aguda, A. H., Nakouzi, N. A. et al. (2020) Ivermectin inhibits HSP27 and potentiates efficacy of oncogene targeting in tumor models. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 130, no. 2, pp. 699–714. <https://doi.org/10.1172/JCI130819> (In English)
- Nikitina, E. A., Kaminskaya, A. N., Molotkov, D. A. et al. (2014a) Effect of heat shock on courtship behavior, sound production, and learning in comparison with the brain content of *limk1* in *Drosophila melanogaster* males with altered structure of the *limk1* gene. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, vol. 50, no. 2, pp. 154–166. <http://dx.doi.org/10.1134/S0022093014020082> (In English)
- Nikitina, E. A., Medvedeva, A. V., Dolgaya, Yu. F. et al. (2012) Involvement of GDNF and LIMK1 and heat shock proteins in *Drosophila* learning and memory formation. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, vol. 48, no. 5–6, pp. 529–539. <https://doi.org/10.1134/S0022093012050076> (In English)
- Nikitina, E. A., Medvedeva, A. V., Zakharov, G. A., Savvateeva-Popova, E. V. (2014b) The *Drosophila* agnostic locus: Involvement to formation of cognitive defects in Williams syndrome. *Acta Naturae*, vol. 6, no. 2 (21), pp. 53–61. <https://doi.org/10.32607/20758251-2014-6-2-53-61> (In English)
- Nikitina, E. A., Zalomaeva, E. S., Medvedeva, A. V. et al. (2024) The role of LIM kinase 1 in memory processes. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, vol. 54, no. 5, pp. 764–780. <https://doi.org/10.1007/s11055-024-01656-0> (In English)
- Panasenko, O. O., Kim, M. V., Gusev, N. B. (2003) Структура и свойства малых белков теплового шока [Structure and properties of small heat shock proteins]. *Uspekhi biologicheskoy khimii — Biochemistry (Moscow)*, vol. 43, pp. 59–98. (In Russian)
- Protein Data Bank. (2024) [Online]. Available at: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (accessed 15.10.2024). (In English)
- PyMOL3. (2024) [Online]. Available at: <https://www.schrodinger.com/products/pymol> (accessed 15.10.2024). (In English)
- PyMOL Molecular Graphics System. (2024) [Online]. Available at: <https://lists.sourceforge.net/lists/listinfo/pymol-users> (accessed 15.10.2024). (In English)
- Ruscher, K., Fernandes, E., Capela, J. P. et al. (2011) Effect of 3,4-methylenedioxyamphetamine on dendritic spine dynamics in rat neocortical neurons — involvement of heat shock protein 27. *Brain Research*, vol. 1370, pp. 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.11.022> (In English)
- Shatov, V. M., Muranova, L. K., Zamotina, M. A. et al. (2023) α -crystallin domains of five human small heat shock proteins (sHsps) differ in dimer stabilities and ability to incorporate themselves into oligomers of full-length sHsps. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, no. 2, article 1085. <https://doi.org/10.3390/ijms24021085> (In English)
- Sheu, S.-Y., Yang, D.-Y., Selzle, H. L., Schlag, E. W. (2003) Energetics of hydrogen bonds in peptides. *Biophysics and Computational Biology*, vol. 100, no. 22, pp. 12683–12687. <https://doi.org/10.1073/pnas.2133366100> (In English)
- Singh, M. K., Sharma, B., Tiwari, P. K. (2017) The small heat shock protein Hsp27: Present understanding and future prospects. *Journal of Thermal Biology*, vol. 69, pp. 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.06.004> (In English)
- Stetler, R. A., Gao, Y., Zhang, L. et al. (2012) Phosphorylation of Hsp27 by protein kinase D is essential for mediating neuroprotection against ischemic neuronal injury. *Journal of Neuroscience*, vol. 32, no. 8, pp. 2667–2682. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5169-11.2012> (In English)
- Structure-guided discovery of ivermectin as an inhibitor of heat shock protein-27 phosphorylation and depolymerization. (2024) [Online]. Available at: <https://pdbj.org/mine/summary/6dv5> (accessed 15.10.2024). (In English)
- Tanaka, K., Takeda, S., Mitsuoka, K. et al. (2018) Structural basis for cofilin binding and actin filament disassembly. *Nature Communications*, vol. 9, article 1860. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04290-w> (In English)
- Tóth, M. E., Szegedi, V., Varga, E. et al. (2013) Overexpression of Hsp27 ameliorates symptoms of Alzheimer's disease in APP/PS1 mice. *Cell Stress and Chaperones*, vol. 18, no. 6, pp. 759–771. <https://doi.org/10.1007/s12192-013-0428-9> (In English)
- Wang, Q., Yuan, W., Yang, X. et al. (2020) Role of cofilin in Alzheimer's disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 8, article 584898. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.584898> (In English)
- Westerheide, S. D., Morimoto, R. I. (2005) Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 39, pp. 33097–33100. <https://doi.org/10.1074/jbc.R500010200> (In English)

- Wimley, W. C., Gawrisch, K., Creamer, T. P., White, S. H. (1996) Direct measurement of salt-bridge solvation energies using a peptide model system: Implications for protein stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, vol. 93, no. 7, pp. 2985–2990. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.7.2985> (In English)
- Wonga, D. Y., Sept, D. (2011) The interaction of cofilin with the actin filament. *Journal of Molecular Biology*, vol. 413, no. 1, pp. 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.08.039> (In English)
- Zalomaeva, E. S., Falina, V. S., Medvedeva, A. V. et al. (2021) Obuchenie i zabyvanie u *Drosophila melanogaster* pri polimorfizme po genu *limk1* [Learning and forgetting in *Drosophila melanogaster* in *limk1* gene polymorphism]. *Integrativnaya fiziologiya — Integrative Physiology*, vol. 2, no. 3, pp. 318–327. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-3-318-327> (In Russian)
- Zatsepina, O. G., Nikitina, E. A., Shilova, V. Y. et al. (2021) Hsp70 affects memory formation and behaviorally relevant gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress and Chaperones*, vol. 26, no. 3, pp. 575–594. <https://doi.org/10.1007/s12192-021-01203-7> (In English)
- Zhuravlev, A. V., Shchegolev, B. F., Zakharov, G. A. et al. (2022) 3-Hydroxykynurenine as a potential ligand for hsp70 proteins and its effects on *Drosophila* memory after heat shock. *Molecular Neurobiology*, vol. 59, no. 3, pp. 1862–1871. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02704-3> (In English)