

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ШАПЕРОНЫ

© 2010 г. Э. Э. Мельников, Т. В. Ротанова[#]

Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. акад. М.М.

Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 07.06.2009 г. Принята к печати 14.07.2009 г.

Шапероны – уникальные ремоделирующие белки, участвующие во множестве внутриклеточных событий и вовлеченные в процессы коррекции структуры белков, предотвращения агрегации неправильно свернутых белков, разрушения белковых агрегатов, а также разворачивания нативных белков-мишеней для транслокации их через мембраны. Кроме того, шапероны участвуют как в разборке активных олигомерных структур до состояния неактивных развернутых мономеров для их последующей протеолитической деградации, так и в формировании специфических комплексов и белковых ансамблей. В обзоре обобщены сведения о строении и функционировании молекулярных шаперонов пяти основных семейств.

Ключевые слова: молекулярные шапероны, ремоделирование белков, белки теплового шока.

Процесс формирования вторичной и высокоспецифической пространственной структуры белка в ходе его рибосомного синтеза, называемый сворачиванием, или фолдингом (folding), необходим для образования активных и жизнеспособных белков [1–5]. Только правильно сложенные белки проявляют стабильность в условиях насыщенного биологического окружения и способность к селективному взаимодействию с природными партнерами. Установлено, что утрата отдельными белками нативной конформации приводит к широкому спектру патологических состояний организма.

Белок, свернутый в функциональную нативную структуру, отличается от того же белка в развернутой конформации высокой степенью компактности, наличием гидрофобного ядра и гидрофильной поверхности, а также выраженной архитектурой, сформированной за счет множественных взаимодействий между боковыми группами аминокислотных остатков полипептидной цепи (водородные связи, гидрофобные и ван-дер-ваальсовы взаимодействия и, в ряде случаев, ковалентные связи) [6, 7]. Вместе с тем, сворачивание растущего линейного полипептида происходит в постоянно меняющихся условиях, что обусловлено изменением его длины и выходом, с определенного момента, N-концевого фрагмента за пределы рибосомы, где негативное влияние на скорость и эффективность процесса

Сокращения: AgP – агрегированный белок; Hsp – белок теплового шока; IP – частично фолдированный белок; NEF – фактор нуклеотидного обмена; NP – рефолдированный белок; sHsp – малый белок теплового шока; TF – триггер-фактор; UfP – развернутый белок.

[#] Автор для связи (тел.: (495) 335-42-22; факс: (495) 335-71-03; эл. почта: rotanova@enzyme.sioc.ras.ru).

сворачивания может оказывать высококонцентрированная клеточная среда (эффект «молекулярной тесноты» (macromolecular crowding) [8]: в частности, в цитозоле бактерий концентрация белка и других макромолекул достигает 300–400 мг/мл) [9].

Некоторые белки в силу особенностей своей аминокислотной последовательности, топологии, размера или функции не способны самопроизвольно организовываться в функциональные трехмерные структуры и проявляют склонность к формированию искаженных (misfolded) структур и к агрегации [10, 11]. Правильному сворачиванию таких белков обычно способствуют либо **ферменты-фолдазы** (например, протеиндисульфидизомераза или пептидилпролил–*цис-транс*-изомераза), катализирующие сборку полипептидной цепи путем образования ковалентных промежуточных комплексов [12–15], либо **молекулярные шапероны** – группа вспомогательных специализированных белков, предохраняющих растущую цепь от ошибочных внутренних и внешних контактов [16–18].

Происхождение понятия «шаперон» и общие функции молекулярных шаперонов

В настоящее время к шаперонам относят, главным образом, белки, способствующие фолдингу вновь синтезирующихся или рефолдингу денатурированных вследствие стресса полипептидных цепей, а также их последующей сборке в биологически активные олигомерные структуры [7, 18]. Впервые же термин «молекулярный шаперон» (chaperone – наставник или посредник) был предложен в 1978 г. для характеристики функции ядерного белка, нуклеоплазмينا, присутствие которого обеспечивало корректность взаимодействия белков-гистонов с ДНК в процессе формирования функционально активных нуклеосом в ооцитах амфибий [19]. Нуклеосомы представляют собой элементарные единицы упаковки хромосомной ДНК в хроматине, сформированные фрагментами цепи ДНК и октамерами гистонов. *In vitro* повышение ионной силы приводит к отделению гистонов от ДНК вследствие нарушения связывающих их электростатических взаимодействий. При понижении концентрации соли в таких растворах образуются нерастворимые агрегированные формы, однако присутствие нуклеоплазмينا в среде приводит к восстановлению нуклеосомного комплекса, несмотря на то, что сам белок не входит в состав нуклеосом.

Со временем стало очевидно, что, кроме ассистирующего участия в сборке макромолекулярных структур и фолдинге белков, шапероны служат также для разрушения белковых агрегатов и разворачивания белков в целях последующей транслокации или презентации их в качестве мишеней протеолитическим ферментам.

Таким образом, молекулярные шапероны можно классифицировать как большую группу разнообразных белков, которые вовлечены в нековалентный фолдинг и/или разворачивание, а также в сборку и/или разборку других макромолекулярных структур *in vivo*, но не являются постоянными компонентами этих структур и не участвуют в реализации ими собственных биологических функций [20].

Биологические функции молекулярных шаперонов заключаются в коррекции структуры и конформации других белков клетке, предотвращении агрегации неправильно свернутых или частично развернутых белков, разрушении и солюбилизации стабильных белковых агрегатов, разворачивании нативных белковых субстратов для транслокации их через мембраны, разборке активных олигомерных структур и поддержании их в состоянии неактивных мономеров, разворачивании активных мономеров для их последующей деградации. Именно шапероны контролируют процессы ремоделирования нативного состояния регуляторных и сигнальных белков в клетке. Таким образом, молекулярные шапероны являются основными компонентами системы контроля качества клеточного протеома [21–24].

Функции шаперонов реализуются через предотвращение (и/или обращение) некорректных взаимодействий ненативных полипептидных цепей, приводящих к образованию биологически нефункциональных продуктов. В такие взаимодействия обычно вовлекаются потенциально способные к взаимодействию фрагменты поверхности макромолекул, экспонированные в концентрированную внутриклеточную среду. Эти фрагменты могут формироваться как на растущих или вновь синтезированных полипептидных цепях, так и на зрелых белках, подвергшихся стрессу, и даже на свернутых белках в их нативных или близких к нативным конформациях. Множественность видов ненативных состояний клеточных белков определяет многочисленность механизмов сворачивания их полипептидных цепей и связанное с этим разнообразие семейств молекулярных шаперонов.

Основные семейства молекулярных шаперонов

Молекулярные шапероны преимущественно являются белками теплового шока (**heat shock proteins**, Hsps), принадлежащими к следующим пяти высококонсервативным семействам: обладающие АТФ-азной активностью белки Hsp100, Hsp90, Hsp70 и Hsp60 (цифры – усредненные значения молекулярных масс в кДа), а также не-АТФ-азные малые белки теплового шока (**small Hsps**, sHsps, мол. массы 12–43 кДа) [25, 26]. Кроме того, недавно обнаружен связанный с рибосомой триггер-фактор (**trigger factor**, TF), обладающий как шапероновой, так и пептидилпролил-*цис-транс*-изомеразной активностью [27, 28]. TF

локализован в области выхода растущего полипептида из рибосомного туннеля и совместно с большой субъединицей рибосомы обеспечивает его котрансляционное сворачивание [29, 30].

Обладающие АТФ-азной функцией шапероны семейств Hsp60–Hsp100 значительно различаются и по структуре, и по олигомерному состоянию, при этом субъединицы всех шаперонов имеют доменную организацию. Основой функционирования шаперонов служит различие сродства их АТФ- и ADP-содержащих форм к белкам-мишеням. Реализация шапероновой функции обычно осуществляется в кооперации с кошаперонами и другими специализированными белками. В клетках прокариот и эукариот шапероны различных семейств формируют консолидированные системы путей, которые, действуя с момента синтеза на рибосоме, обеспечивают полипептидным субстратам достижение функционального состояния на заключительных стадиях фолдинга [31]. Молекулярные шапероны широко представлены в цитозоле, эндоплазматическом ретикулуме, в митохондриях и хлоропластах, причем, каждой органелле присущ собственный специфический набор шаперонов [24].

Шапероны и фолдинг белков

Правильное сворачивание вновь синтезируемых белков в клетке и белков с частично нарушенной структурой, а также сохранение структуры белков в условиях стресса обусловлено функционированием шаперонов семейств Hsp70, Hsp60 и Hsp90.

Фолдинг растущего в процессе трансляции полипептида обеспечивается его взаимодействием сначала с фактором TF, а затем, при достаточном удлинении полипептидной цепи – с системой **шаперона Hsp70**, включающей собственно шаперон, кошаперон Hsp40 и факторы нуклеотидного обмена (**nucleotide exchange factor, NEF**) [32, 33]. Наиболее изученной является каноническая Hsp70-система *Escherichia coli*, состоящая из шаперона DnaK, кошаперона DnaJ и NEF-белка GrpE, причем, белки DnaJ и GrpE функционируют в системе в форме димеров. Геномы множества организмов – от бактерий до высших эукариот – кодируют белки, гомологичные белкам системы DnaK–DnaJ–GrpE. Образование временных комплексов Hsp70 с ненативными белками-мишенями предотвращает неспецифическую агрегацию и деградацию последних внутриклеточными протеиназами и, тем самым, способствует правильному фолдингу диссоциированной мишени, происходящему либо спонтанно, либо с участием других шаперонов. Еще одним проявлением функциональной активности шаперонов Hsp70 служит их участие (совместно с шаперонами Hsp100) в сольюбилизации и рефолдинге агрегированных белков [26, 33].

По современным представлениям [34], шапероны Hsp70 состоят из трех доменов (рис. 1): высококонсервативный *N*-концевой нуклеотидсвязывающий домен (NB, около 450 а.о.) объединен чувствительным к действию протеиназ линкерным участком с варибельным субстратсвязывающим доменом (SB, около 200 а.о.). Короткий *C*-концевой домен (СТ, около 100 а.о.) способен к взаимодействию с различными партнерными белками и модулированию шапероновой функции Hsp70. АТФ-форма Hsp70 обладает низким сродством к белкам-мишеням и высокой скоростью обмена субстратов, в то время как его ADP-форма проявляет высокую аффинность к субстратам и демонстрирует низкую скорость их обмена. Двудоменные кошапероны Hsp40 (рис. 1) служат регуляторами АТФ-азной и шапероновой активностей Hsp70.

Связывание полипептидных субстратов-мишеней с Hsp70 опосредовано предварительным образованием комплексов мишень–кошаперон с участием *C*-концевого домена Hsp40 (*а*). На следующей стадии *N*-концевой J-домен Hsp40 взаимодействует с NB-доменом шаперона, а находящийся в вытянутой конформации специфический фрагмент белка-мишени (4–5 гидрофобных остатков, ограниченных основными аминокислотами) – с его SB-доменом (*б*). Связывание и высвобождение субстрата контролируется особым α -спиральным фрагментом Hsp70, функционирующим как «крышка» или «колпак». Положение крышки зависит от конформационных изменений в NB-домene шаперона, вызываемых связыванием и гидролизом АТФ. Кошаперон Hsp40 влияет на этот цикл, стимулируя гидролиз нуклеотида шапероном Hsp70, в то время как взаимодействие фактора NEF с NB-доменом шаперона (*в*) способствует высвобождению ADP (*г*) и последующему связыванию АТФ, что приводит к диссоциации белка-мишени и возобновлению цикла (*д*). Считается, что от 10 до 20% вновь синтезирующихся белков как в прокариотах, так и в эукариотах подвергаются правильному фолдингу с участием системы Hsp70–Hsp40–NEF [25, 35].

Рефолдинг ненативных (нефункциональных) полипептидов, представляющих собой как цепи, новообразованные в процессе биосинтеза, так и денатурированные формы белков, возникшие в результате клеточного стресса, осуществляется с помощью **шаперониновой системы**. Шаперонины (или *шапероны Hsp60*) – это двухкамерные бочкообразные структуры, сформированные двумя состыкованными олигомерными (обычно – гептамерными) кольцами Hsp60, которые способны на своих противоположных поверхностях попеременно связывать и инкапсулировать белки, подлежащие рефолдингу [36–40]. При этом шаперонины узнают гидрофобные кластеры белковых мишеней, находящихся в состоянии «расплавленной глобулы» (molten globule) – промежуточном

между нативным и развернутым состояниями белка, характеризующимся ослаблением взаимодействий между боковыми группами в аминокислотной цепи [41, 42].

Наиболее изученным является шаперонин GroEL *E. coli*, функционирующий в комплексе с кошаперонином GroES. Каждая субъединица гептамерного «кольца» GroEL (M 57 кДа) состоит из трех доменов: апикального («верхушечного», Ap), содержащего общий центр связывания ненативных белков и кошаперонина, шарнирного промежуточного (In) и С-концевого экваториального (Eq), несущего АТР-азный центр (рис. 2). Экваториальные домены обеспечивают большую часть межсубъединичных контактов как внутри гептамерного кольца, так и между кольцами шаперона. Взаимодействие экваториальных доменов двух колец GroEL приводит к образованию зеркально симметричного тороида с двумя изолированными гидрофобными полостями (*транс*-состояние колец), входные отверстия которых сформированы апикальными доменами [39]. Субъединицы кошаперонина GroES (M 10 кДа) также образуют циклический гептамерный куполообразный комплекс, способный прикрывать один из торцов тороида GroEL. Это приводит к значительным конформационным изменениям шаперонина, увеличению размеров полости и ее гидрофилизации (*цис*-состояние кольца). Основные этапы рефолдинга белков шаперониновой системой представлены на рис. 2.

Взаимодействие ненативных полипептидов с тремя или четырьмя из семи гидрофобных центров Ap-доменов [26] фиксирует белок-мишень на открытом *транс*-кольце GroEL (рис. 2а). При этом в соседнем *цис*-кольце происходит гидролиз АТР и рефолдинг ранее связанной мишени. Образование ADP в *цис*-кольце способствует кооперативному связыванию АТР во всех семи Eq-доменах *транс*-кольца (одновременное заполнение центров, концертный механизм), что приводит к снижению гидрофобности Ap-доменов [43] и освобождению мишени. Одновременно происходит быстрое связывание кошаперонина GroES и переход кольца в *цис*-состояние, сопровождающийся инкапсулированием мишени в гидрофильную полость, где агрегация белка становится невозможной (б). Эти превращения индуцируют быстрое (менее чем за 1 с [38]) высвобождение сначала GroES и рефолдированной мишени, а затем ADP из соседнего кольца (в), и приводят к активации гидролиза АТР и рефолдинга мишени в *цис*-кольце (г). При этом за время около 20 с мишень претерпевает ряд структурных изменений, включая стадию разворачивания [37]. Предполагается, что ускорение фолдинга мишени во внутренней камере комплекса GroEL–GroES обеспечивается ограничением конформационного пространства и связанным с ним изменением энергетического профиля (energy landscape) процесса, что позволяет мишени достичь нативного или приближенного к нему состояния [36]. Параллельно происходит присоединение новой молекулы мишени в соседнем кольце, начинающее очередной цикл (д–

е) рефолдинга белка. Следует отметить, что в работе [36] не исключается возможность взаимодействия белка-мишени и с ADP-связанной формой *транс*-кольца GroEL.

Представленный выше *цис*-механизм фолдинга реализуется по отношению к относительно небольшим мишеням, способным разместиться внутри полости *цис*-кольца системы GroEL–GroES. Крупные белки, инкапсулирование которых невозможно, подвергаются фолдингу по *транс*-механизму, согласно которому связывание мишени и кошаперонина GroES происходит на противоположных кольцах GroEL [44]. Продуктивный фолдинг осуществляется в течение короткого времени (около 1 с) пребывания мишени в окружающей среде между этапами ее высвобождения и повторного связывания шаперонином [44]. Фолдинг по *транс*-механизму осложняется вероятностью агрегации промежуточных форм рефолдируемых мишеней и по эффективности заметно отстает от фолдинга по *цис*-механизму. Считается, что *транс*-фолдинг системой GroEL–GroES реализуется для мультидоменных белковых мишеней [38].

В любом случае функционирование шаперонинов, регулируемое гидролизом АТР, характеризуется тремя основными признаками [36, 38]: (1) отрицательной кооперативностью между кольцами GroEL, определяющей асимметричное функционирование системы, (2) неконкурентным ингибированием гидролиза АТР при наличии ADP в смежном кольце и (3) необходимостью наличия связанного нуклеотида в шаперонине GroEL для реализации связывания кошаперонина GroES.

Группа ***шаперонов Hsp90*** обеспечивает сохранение в условиях стресса структуры и свойств целого ряда белков, участвующих в различных сигнальных путях в клетке. Эти шапероны являются основными компонентами комплексных систем, включающих как другие шапероны, так и многочисленную сеть разнообразных кошаперонов. Шапероны Hsp90, необходимые для выживаемости клеток, широко распространены в бактериях и эукариотах, но не обнаружены до сих пор в архебактериях [45, 46]. При нормальных условиях они играют основную роль в секреторных путях и внутриклеточном транспорте; в условиях стресса белки Hsp90 вовлекаются в клеточный цикл, мейоз и цитокинез [26, 47].

Hsp90-система участвует в конформационной регуляции и поддержании активности так называемых «клиентных» белков, которые подразделяются на три основные группы. Наибольшая группа включает протеинкиназы, другая представляет факторы транскрипции и ядерные рецепторы стероидных гормонов, в то время как последняя группа объединяет структурно неродственные белки, в том числе белки вирусной репликации (viral-replication) и внутриклеточные рецепторы, связанные с врожденным иммунитетом. Кроме того, совместно с Hsp70, шапероны Hsp90 стабилизируют вновь синтезированные белки, пребывающие в метастабильном состоянии, а также участвуют в сборке/разборке

мультибелковых комплексов. Вместе с тем, полный объем клеточных функций и механизм действия Hsp90 до сих пор до конца не установлены.

Субъединица шаперона Hsp90 построена из трех последовательно связанных доменов (рис. 3): N-концевого АТР-связывающего (N-домен, ~25 кДа), центрального (М-домен, ~35 кДа), включающего каталитическую петлю с остатком аргинина, важным для гидролиза АТР, и С-концевого (С-домен, ~20 кДа) [26, 45–48]. Hsp90-белки в апоформе образуют «раскрытые» V-образные димеры за счет межсубъединичных контактов С-доменов. Связывание АТР приводит к сближению субъединиц и возникновению контакта между N-доменами с образованием закрытой формы шаперона [49–52]. ADP-форма Hsp90 представляет собой «полураскрытый» V-димер. В аллостерические междоменные взаимодействия в шапероне вовлечены специфические куполоподобные фрагменты структуры – «крышки», локализованные в N-доменах и прикрывающие центры связывания АТР, а также каталитические петли М-доменов. Регуляция функциональной активности Hsp90 осуществляется с помощью набора кошаперонов, которые могут связываться с разными доменами Hsp90 (например, Нор-белок взаимодействует с С-доменом, Cdc37 – с N-доменом, а Aha1 – с М-доменом).

Недавно с помощью электронной микроскопии была впервые установлена последовательность событий в процессе ремоделирования одной из протеинкиназ комплексом Hsp90–кошаперон (рис. 3) [48]. Оказалось, что димер Hsp90 дрожжей связывает димер кошаперона Cdc37 (cell-division cycle 37 homologue) в центральной щели, образованной N-доменами, а мономер протеинкиназы Cdk4 (cyclin-dependent kinase 4) – на боковой поверхности комплекса (рис. 3а). При этом один из доменов киназы взаимодействует с N-концевой, а другой – с центральной (М) областями шаперона Hsp90. Последовательное высвобождение субъединиц Cdc37 (б, в) и реализация АТР-азного цикла вызывают ряд конформационных изменений в димере Hsp90, что приводит к возникновению напряжений в связанном белке-клиенте, его ремоделированию и высвобождению (в, г).

Шапероны Hsp100 и деагрегация белков

Изменение условий среды (например, увеличение температуры или окислительный стресс) может приводить к такому изменению конформации клеточных белков, при котором гидрофобные аминокислотные остатки, погруженные внутрь белков в их нативных конформациях, экспонируются в клеточную среду, способствуя внутриклеточной агрегации белков. Толерантность к повреждающим факторам, обеспечивающая выживание клетки в дестабилизирующих условиях шока, обусловлена повышением уровня синтеза белков **группы Hsp100-шаперонов**, участвующих в разрушении белковых агрегатов. В частности, в

бактериальных клетках функционирует Hsp100-шаперон ClpB, а в клетках растений и дрожжей – его ортологи Hsp101 и Hsp104 [35]. Установлено, что в большинстве случаев дезагрегация белков осуществляется кооперативно действующей бишапероновой системой Hsp70–Hsp100 [26, 34, 35], причем, конформационные свойства полипептидных мишеней, формирующих агрегаты, служат важнейшим фактором, определяющим необходимость участия шаперонов Hsp100 в процессе дезагрегации [53].

Шапероны Hsp100 принадлежат к суперсемейству AAA⁺-белков (АТР-аз, ассоциированных с различными клеточными активностями) – механоферментов, использующих энергию гидролиза АТР для конформационного ремоделирования связанных белковых мишеней, опосредованного их разворачиванием («анфолдазная» активность шаперонов Hsp100) [54–57]. AAA⁺-белки характеризуются наличием одного или двух специфических доменов (AAA⁺-модули) размером около 250 а.о., содержащих ряд областей высокой консервативности [57–59], а также структурно независимого экстрадомена, локализованного либо в N-концевой области белка, либо внутри его AAA⁺-модуля [60]. Межсубъединичные взаимодействия AAA⁺-модулей приводят к образованию характерных для AAA⁺-белков кольцевых гексамерных, а иногда и гептамерных структур.

Субъединицы Hsp100-шаперона ClpB и его ортологов содержат N-концевые экстрадомены и по два соединенных вариабельными линкерами AAA⁺-модуля (AAA⁺-1 и AAA⁺-2), важных как для олигомеризации, так и для проявления шапероновой функции [35]. Согласно результатам рентгеноструктурного анализа, ClpB имеет классическую бочкоподобную AAA⁺-упаковку и формирует двухъярусное гексамерное кольцо с центральным каналом диаметром около 16 Å (рис. 4) [35]. Кольцо верхнего яруса, образованное AAA⁺-1-модулями, подвергается конформационным изменениям, сопряженным с гидролизом АТР. Это же кольцо включает в себя уникальный пропеллерообразный домен (middle domain, М-домен), имеющий coiled coil-конформацию, сформированную четырьмя α-спиралями [61, 62]. Мобильный М-домен, локализующийся на внешней стороне гексамера ClpB, проявляет регуляторные функции, контролируя как АТР-азную активность шаперона ClpB, так и DnaK-зависимое связывание агрегированных белков с аксиальным каналом ClpB (рис. 4) [63]. Считается, что система Hsp70-шаперона DnaK способствует изменению физических свойств агрегатов, инициирует высвобождение отдельного полипептида из белкового агрегата (AgP) и перемещает его к ClpB. При этом N-концевой экстрадомен, расположенный на вершине AAA⁺-1-кольца, обеспечивает дополнительное взаимодействие шаперона с агрегатами. В процессе транслокации полипептида сквозь центральный канал ClpB, промотируемой гидролизом АТР, происходит

его разворачивание. Высвобожденный в среду развернутый полипептид (UfP) подвергается рефолдированию (либо спонтанному, либо с участием других шаперонов).

Роль специфического М-домена исключительно важна для сопряжения активности DnaK и ремоделирующей функции ClpV как основной клеточной дезагрегазы [64]. Наличие характерного М-домена отличает шапероны, вовлеченные в процессы дезагрегации, от других членов суперсемейства AAA⁺-белков (например, ClpA и ClpX), которые проявляют двойственные функции, действуя либо как регуляторные субъединицы АТР-зависимых протеиназ, либо как собственно молекулярные шапероны-анфолдазы.

Интересно, что в дрожжевом ортологе ClpV – шапероне Hsp104 методом крио-электронной микроскопии была выявлена абсолютно иная упаковка AAA⁺-доменов, в которой гексамерное кольцо образует не узкий канал, а обширную полость, так что соседствующие субъединицы не могут быть связаны обычными для AAA⁺-белков контактами через консервативные остатки аргинина («аргининовые пальцы» [55, 57]). М-домены в такой структуре заключены между AAA⁺-модулями шаперона и могут вступать в непосредственные взаимодействия и с полипептидными мишенями в AAA⁺-1-области канала и с нуклеотидсвязывающими центрами, используя для этих контактов альтернативные остатки аргинина [65].

Малые Hsp-белки

Малые белки семейства Hsp (*sHsps*) широко представлены в клетках всех известных организмов [6, 26, 35]. sHsps-шапероны не содержат нуклеотидсвязывающих центров. Они с высокой эффективностью связывают широкий набор клеточных белков в их ненативных конформациях, предотвращая тем самым агрегацию субстратов. В противоположность шаперонам других семейств каждый олигомер sHsp способен удерживать по несколько ненативных белковых субстратов [66]. Высвобождение белков-мишеней из комплексов с sHsps происходит в кооперации с АТР-зависимыми шаперонами, что позволяет рассматривать sHsp-белки в качестве «резервуаров» ненативных белков для их последующего рефолдинга [66, 67].

Среди всех групп молекулярных шаперонов sHsp-белки выделяются своим структурным разнообразием, но их общими отличительными признаками служат наличие в центральной части последовательности домена размером около 100 а.о. со структурой, характерной для α-кристаллина хрусталика глаза животных [66, 67], а также существование в форме крупных олигомеров (от 12 до 24 субъединиц), построенных из димеров и имеющих консервативную структурную организацию, в виде сферического или дискообразного комплекса с пронизывающим его центральным каналом [66–68].

Олигомеры sHsps зачастую проявляют полидисперсность по степени олигомеризации и обладают способностью к быстрому обмену субъединиц, особенно выраженной при повышенных температурах, что рассматривается в качестве ключевого фактора в предотвращении агрегации белка в процессе тепловой денатурации. Недавние исследования показали, что sHsp-белки возможно вносят вклад и в поддержание целостности мембран, особенно, в условиях стресса [68].

Шапероны разных семейств в фолдинге белка

Механизм сворачивания полипептидных цепей в клетке с образованием функционально активных белков остается одной из центральных проблем молекулярной биологии [69, 70]. В настоящее время стало очевидным, что формирование уникальных пространственных структур значительной части вновь синтезированных полипептидных цепей и функциональных ассоциатов белков требует помощи шаперонов разных семейств. Однако степень интеграции между различными компонентами шапероновых ансамблей остается не до конца выясненной.

Функционирование шаперонов в клетках прокариот и эукариот не имеет принципиальных отличий [7, 71]. Совокупные пути шаперонзависимого фолдинга белка-мишени в клетке *E. coli* схематически представлены на рис. 5. Высвобождающаяся из рибосомного туннеля полипептидная цепь встречается с TF-шапероном, а затем – с системой Hsp70 (DnaK–DnaJ–GrpE) (1), промотирующей фолдинг либо до нативного состояния (NP) (2), либо до белка в частично свернутой конформации (промежуточная форма IP) (3). Завершение фолдинга ненативного полипептида IP может происходить по двум направлениям: путем повторного взаимодействия с системой Hsp70 (4), которое может включать стадию стабилизации белка IP связыванием его с малыми белками теплового шока sHsps (4', 4''), или путем взаимодействия с системой шаперонина Hsp60 (GroEL–GroES) (5). Кроме того, белок IP может агрегировать (6) с образованием формы AgP (эта же форма может образоваться из нативного белка в условиях теплового стресса (7)–(6)) или подвергнуться энергозависимому протеолизу (8). Дезагрегация белка AgP Hsp100-шапероном ClpB в кооперации с системой Hsp70 (9) и последующий рефолдинг развернутого белка (UfP) завершает сворачивание мишени.

Считается, что сворачивание белков небольших размеров может осуществляться котрансляционно с участием только фактора TF. Для фолдинга белков среднего размера (25–60 кДа) помимо фактора TF необходима система Hsp70 и, в ряде случаев, шаперонины Hsp60, функционирующие по *цис*-механизму. В формировании структуры крупных мультидоменных белков участвуют шапероны всех семейств, при этом взаимодействие

шаперонинов Hsp60 с белком-мишенью происходит по *транс*-механизму. Крайне важно подчеркнуть, что кооперация шаперонов разных семейств позволяет не только ремоделировать белки разного размера, но и преодолеть эффекты высокой концентрации растущих цепей и «молекулярной тесноты» в живой клетке.

Молекулярные шапероны обеспечивают фолдинг примерно половины синтезирующихся внутриклеточных белков. Роль шапероновой системы в сохранности клеточного протеома особенно возрастает в условиях стресса. Шапероны различных семейств ориентированы на связывание белковых мишеней, пребывающих в различных ненативных состояниях, и, в связи с этим, характеризуются различающейся специфичностью. Так, шапероны Hsp70 взаимодействуют с белками-мишенями путем узнавания их 4–6-членных гидрофобных пептидных сегментов, а шаперонины Hsp60 узнают более структурированные гидрофобные области в мишенях, обладающих выраженной вторичной структурой. Вместе с тем, общим механизмом всех функционирующих шаперонов (кроме фактора TF и малых белков теплового шока) служит многократное повторение этапов регулируемого гидролизом АТР связывания/высвобождения нестабильных конформеров белковых мишеней.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 08-04-00977).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hendrick J.P., Hartl F.U. // FASEB J. 1995. V. 9. P. 1559–1569.
2. Птицын О.Б., Финкельштейн А.В., Добсон К.М. // Мол. биол. 1999. Т. 33. С. 1012–1015.
3. Frydman J. // Ann. Rev. Biochem. 2001. V. 70. P. 603–647.
4. Hartl F.U., Hayer-Hartl M. // Science. 2002. V. 295. P. 1852–1858.
5. Dobson C.M. // Semin. Cell. Dev. Biol. 2004. V. 15. P. 3–16.
6. Мюльберг А.А. Фолдинг белка. Изд-во С.-Петербург. унив., 2004. 155 с.
7. Christis Ch., Lubsen N.H., Braakman I. // FEBS J. 2008. V. 275. P. 4700–4727.
8. Ellis R.J. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2001. V. 11. P. 114–119.
9. Попов Е.М., и др. Проблема белка. В 5 т. Т. 2. Пространственное строение белка. М.: Наука, 1996. С. 406–430.
10. Dobson C.M. // Nature. 2003. V. 426. P. 884–890.
11. Ecroyd H., Carver J.A. // IUMBM Life. 2008. V. 60. P. 769–774.
12. Fuchs S., De Lorenzo F., Anfinsen C.B. // J. Biol. Chem. 1967. V. 242. P. 398–402.
13. Edman J.C., Ellis L., Blacher R.W., Roth R.A., Rutter W.J. // Nature. 1985. V. 317. P. 267–270.
14. Compton L.A., Davis J.M., Macdonald J.R., Bächinger H.P. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 206. P. 927–934.
15. Göthel S.F., Marahiel M.A. // Cell. Mol. Life Sci. 1999. V. 55. P. 423–436.
16. Ellis R.J. // Nature. 1987. V. 328. P. 378–379.
17. Ellis R.J., Hemmingsen S.M. // Trends Biochem. Sci. 1989. V. 14. P. 339–342.
18. Ellis R.J. // Semin. Cell. Biol. 1990. V. 1. P. 1–9.
19. Laskey R.A., Honda B.M., Mills A.D., Finch J.T. // Nature. 1978. V. 275. P. 416–420.
20. Ellis R.J. // Trends Biochem. Sci. 2006. V. 31. P. 395–401.
21. Lee S., Tsai F.T. // J. Biochem. Mol. Biol. 2005. V. 38. P. 259–265.
22. Bukau B., Weissman J., Horwich A. // Cell. 2006. V. 125. P. 443–451.
23. Mogk A., Haslberger T., Tessarz P., Bukau B. // Biochem. Soc. Trans. 2008. V. 36(Pt 1). P. 120–125.
24. Anelli T., Sitia R. // EMBO J. 2008. V. 27. P. 315–327.
25. Goloubinoff P., De Los Rios P. // Trends Biochem. Sci. 2007. V. 32. P. 372–380.
26. Saibil H.R. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2008. V. 18. P. 35–42.
27. Maier R., Scholz C., Schmid F.X. // J. Mol. Biol. 2001. V. 314. P. 1181–1190.
28. Liu C.P., Perrett S., Zhou J.M. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 13315–13320.
29. Kramer G., Rauch T., Rist W., Vorderwülbecke S., Patzelt H., Schulze-Specking A., Ban N., Deuerling E., Bukau B. // Nature. 2002. V. 419. P. 171–174.

30. Teter S.A., Houry W.A., Ang D., Tradler T., Rockabrand D., Fischer G., Blum P., Georgopoulos C., Hartl F.U. // *Cell*. 1999. V. 97. P. 755–765.
31. Young J.C., Agashe V.R., Siegers K., Hartl F.U. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2004. V. 5. P. 781–791.
32. Burston S.G., Clarke A.R. // *Essays Biochem.* 1995. V. 29. P. 125–136.
33. Mayer M.P., Bukau B. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2005. V. 62. P. 670–684.
34. Genevaux P., Georgopoulos C., Kelley W.L. // *Mol. Microbiol.* 2007. V. 66. P. 840–857.
35. Liberek K., Lewandowska A., Zietkiewicz S. // *EMBO J.* 2008. V. 27. P. 328–335.
36. Bigotti M.G., Clarke A.R. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2008. V. 474. P. 331–339.
37. Lin Z., Rye H.S. // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2006. V. 41. P. 211–239.
38. Chaudhuri T.K., Verma V.K., Maheshwari A. // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2009. V. 99. P. 42–50.
39. Xu Z., Horwich A.L., Sigler P.B. // *Nature*. 1997. V. 388. P. 741–750.
40. Наградова Н.К. // *Биохимия*. 2004. Т. 69. С. 1027–1037.
41. Птицын О.Б. // *Биохимия*. 1998. Т. 63. С. 435–443.
42. Gómez-Puertas P., Martín-Benito J., Carrascosa J.L., Willison K.R., Valpuesta J.M. // *J. Mol. Recognit.* 2004. V. 17. P. 85–94.
43. Wang J., Boisvert D.C. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 327. P. 843–855.
44. Farr G.W., Fenton W.A., Chaudhuri T.K., Clare D.K., Saibil H.R., Horwich A.L. // *EMBO J.* 2003. V. 22. P. 3220–3230.
45. Pearl L.H., Prodromou Ch. // *Ann. Rev. Biochem.* 2006. V. 75. P. 271–294.
46. Zhao R., Houry W.A. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007. V. 594. P. 27–36.
47. McClellan A.J., Xia Y., Deutschbauer A.M., Davis R.W., Gerstein M., Frydman J. // *Cell*. 2007. V. 131. P. 121–135.
48. Pearl L.H., Prodromou Ch., Workman P. // *Biochem. J.* 2008. V. 410. P. 439–453.
49. Chadli A., Bouhouche I., Sullivan W., Stensgard B., McMahon N., Catelli M.G., Toft D.O. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 12524–12529.
50. Prodromou C., Panaretou B., Chohan S., Siligardi G., O'Brien R., Ladbury J.E., Roe S.M., Piper P.W., Pearl L.H. // *EMBO J.* 2000. V. 19. P. 4383–4392.
51. Pearl L.H., Prodromou Ch. // *Adv. Protein Chem.* 2001. V. 59. P. 157–186.
52. Terasawa K., Minami M., Minami Y. // *J. Biochem.* 2005. V. 137. P. 443–447.
53. Lewandowska A., Matuszewska M., Liberek K. // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 371. P. 800–811.
54. Neuwald A.F., Aravind L., Spouge J.L., Koonin E.V. // *Genome Res.* 1999. V. 9. P. 27–43.
55. Iyer L.M., Leippe D.D., Koonin E.V., Aravind L. // *J. Struct. Biol.* 2004. V. 146. P. 11–31.
56. Hanson P.I., Whiteheart S.W. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2005. V. 6. P. 519–529.
57. Lupas A.N., Martin J. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2002. V. 12. P. 746–753.
58. Erzberger J.P., Berger J.M. // *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2006. V. 35. P. 93–114.

59. *Tucker P.A., Sallai L. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2007. V. 17. P. 641–652.*
60. *Singh S.K., Rozycki J., Ortega J., Ishikawa T., Lo J., Steven A.C., Maurizi M.R. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 29420–29429.*
61. *Lee S., Sowa M.E., Watanabe Y.H., Sigler P.B., Chiu W., Yoshida M., Tsai F.T. // Cell. 2003. V. 115. P. 229–240.*
62. *Schirmer E.C., Glover J.R., Singer M.A., Lindquist S. // Trends Biochem. Sci. 1996. V. 21. P. 289–296.*
63. *Watanabe Y.H., Nakazaki Y., Suno R., Yoshida M. // Biochem. J. 2009. V. 421. P. 71–77.*
64. *Mogk A., Haslberger T., Tessarz P., Bukau B. // Biochem. Soc. Trans. 2008. V. 36. P. 120–125.*
65. *Wendler P., Shorter J., Plisson C., Cashikar A.G., Lindquist S., Saibil H.R. // Cell. 2007. V. 131. P. 1366–1377.*
66. *Haslbeck M. // Cell. Mol. Life Sci. 2002. V. 59. P. 1649–1657.*
67. *Haslbeck M., Franzmann T., Weinfurter D., Buchner J. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2005. V. 12. P. 842–846.*
68. *Nakamoto H., Vigh L. // Cell. Mol. Life Sci. 2007. V. 64. P. 294–306.*
69. *Feldman D.E., Frydman J. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2000. V. 10. P. 26–33.*
70. *Houry W.A. // Curr. Prot. Pept. Sci. 2001. V. 2. P. 227–244.*
71. *Kolaj O., Spada S., Robin S., Wall J.G. // Microb. Cell Fact. 2009. V. 8. P. 9–26.*

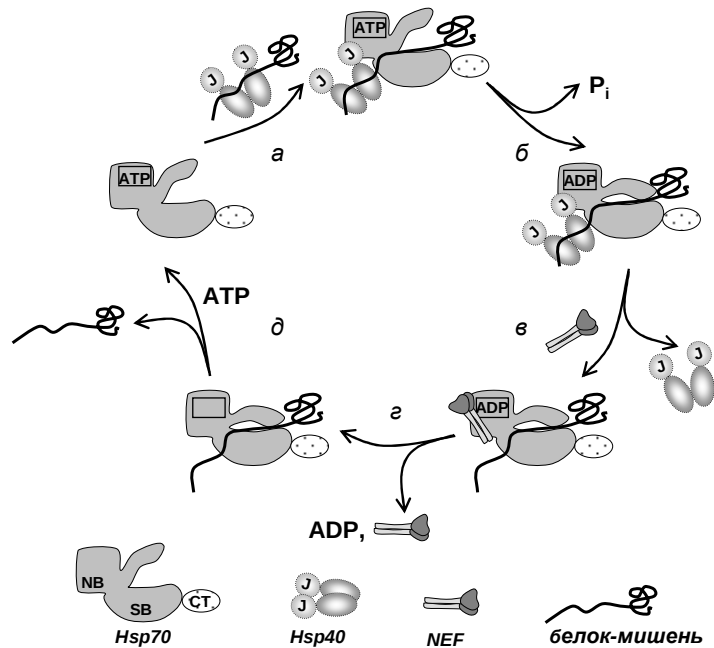


Рис. 1. Цикл функционирования системы шаперона Hsp70 (по данным работ [7 и 34]). Шаперон Hsp70: NB – нуклеотидсвязывающий домен, SB – субстратсвязывающий домен, CT – С-концевой домен; кошаперон Hsp40: J – консервативный N-концевой домен; NEF – фактор нуклеотидного обмена.

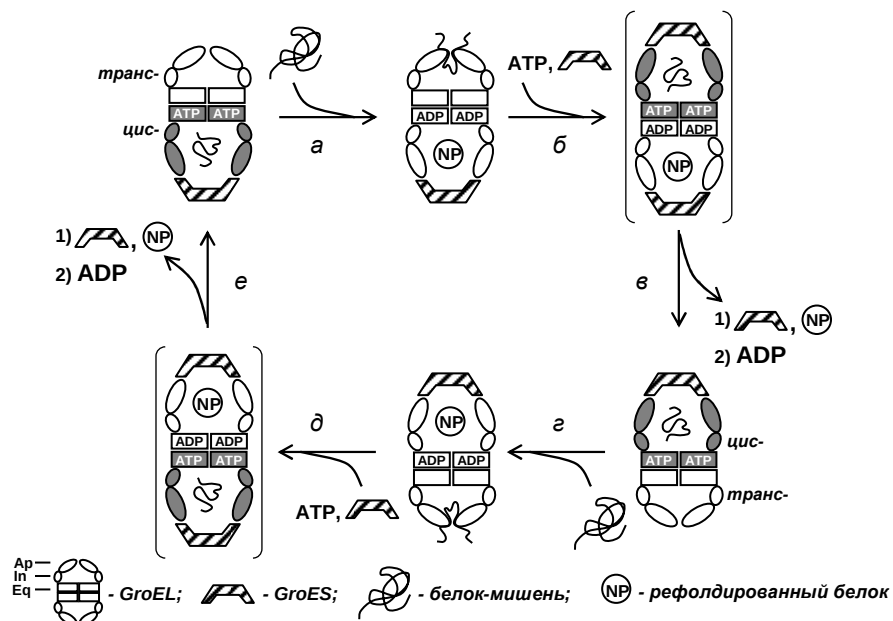


Рис. 2. Рефолдинг белкового субстрата шаперониновой системой *E. coli* (GroEL–GroES-комплекс показан в разрезе, вид сбоку; различие конформационных состояний АТФ- и АДФ-содержащих форм GroEL показано серым цветом; по данным работ [4, 36, 38 и 40]). Шаперонин GroEL: Ap, In и Eq – апикальный, промежуточный и экваториальный домены; GroES – кошаперонин; NP – рефолдированный белок-мишень.

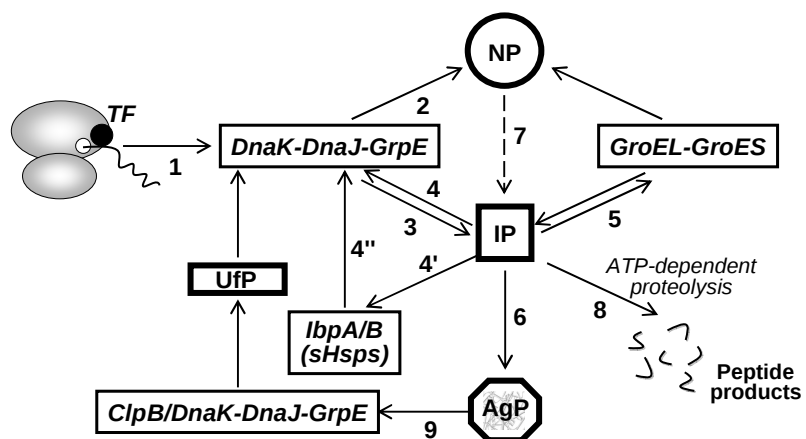


Рис. 5. Схематическое представление процесса фолдинга белка в цитоплазме *E. coli* с участием основных групп шаперонов (по данным работы [71]). IbpA/B – малые белки теплового шока.