Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2025;29(1):7-14

doi 10.18699/vjgb-25-02

Белки теплового шока в фолдинге и реактивации белков

Д. Малькеева [1], Е.В. Киселева [1], С.А. Фёдорова [1, 2]

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия
fsveta@bionet.nsc.ru

Аннотация. В процессе жизнедеятельности в каждой клетке происходят синтез новых белков и удаление старых, денатурированных белков и нерастворимых белковых агрегатов. В поддержании протеостаза значительную роль играют шапероны, которые участвуют в придании правильной конформации (фолдинге) многих белков и способствуют деградации денатурированных или неправильно свернутых белков посредством протеаз или аутофагии. Несмотря на то что фолдинг белков – довольно точный процесс, с возрастом и под воздействием стресса накапливаются ошибки, приводящие к образованию нерастворимых белковых агрегатов, которые могут вызывать различные патологии. Воздействие стрессовых факторов, таких как повышенная температура и изменение кислотности среды, также может способствовать изменению нативной конформации белков, в результате чего они могут не только терять выполняемые в норме функции, но и приобретать новые цитотоксические свойства. В связи с увеличением средней продолжительности жизни человека в мире отмечается рост протеинопатий – заболеваний, связанных с нарушением протеостаза, к которым относятся, например, болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона; поэтому выявление механизмов, препятствующих накоплению и способствующих удалению цитотоксичных агрегатов, стало актуальной задачей. Белки теплового шока (heat shock proteins, HSP) – молекулярные шапероны, принимающие участие как в придании правильной конформации вновь синтезированным белкам, так и в рефолдинге денатурированных белков с их последующей реактивацией. HSP разнообразны по структуре и выполняемым функциям и встречаются у всех изученных про- и эукариотических организмов. HSP синтезируются в клетке постоянно. Выработка множества из них многократно усиливается при стрессах, включая тепловой (за что они и получили свое название) и метаболический стресс, возникающий из-за повышения количества неправильно свернутых белков. В настоящем обзоре описаны механизмы действия и функции представителей пяти семейств HSP в фолдинге и реактивации белков.

Ключевые слова: белки теплового шока; молекулярные шапероны; фолдинг белков; контроль качества белков; HSP.

Для цитирования: Малькеева Д., Киселева Е.В., Фёдорова С.А. Белки теплового шока в фолдинге и реактивации белков. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(1):7-14. doi 10.18699/vjgb-25-02

Финансирование. Работа Киселевой Е.В. и Фёдоровой С.А. поддержана программой фундаментальных научных исследований по проекту № FWNR-2022-0015.

Heat shock proteins in protein folding and reactivation

D. Malkeyeva [1], E.V. Kiseleva [1], S.A. Fedorova [1, 2]

[1] Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[2] Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia
fsveta@bionet.nsc.ru

Abstract. Throughout their lives, cells synthesise new and dispose of the old, denatured proteins and insoluble protein aggregates. An important role in maintaining proteostasis is played by chaperones, which fold various proteins and promote degradation of denatured or misfolded proteins via proteasomes or autophagy. Despite protein folding being an accurate process, as organisms age and experience stress, errors accumulate, which leads to the formation of protein aggregates that can result in pathological changes. In addition, stress factors such as elevated temperature and altered pH can promote protein denaturation that can result in the proteins not only losing their native functions, but also gaining novel cytotoxic properties. With the increase of human average lifespan, more and more cases of proteinopathies – diseases caused by disruptions in proteostasis, e.g. Alzheimer's disease, Huntington's disease etc. – emerge. Therefore, identification of mechanisms preventing the formation of cytotoxic protein aggregates and promoting their clearance is of high importance. Heat shock proteins (HSPs) are the molecular chaperones involved in folding nascent proteins and refolding the denatured ones, leading to their reactivation. Heat shock proteins vary in structure and functions and are found in all prokaryotes and eukaryotes discovered to date. HSPs are constantly synthesised in cells under normal

© Малькеева Д., Киселева Е.В., Фёдорова С.А., 2025
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

conditions, and a multitude of them are dramatically up-regulated during stress, which includes heat shock (which earned them their name) and metabolic stress caused by the increased numbers of misfolded proteins. In this review, we describe mechanisms of action and functions of members of five heat shock protein families.
Key words: heat shock proteins; molecular chaperones; protein folding; protein quality control; HSP.

For citation: Malkeyeva D., Kiseleva E.V., Fedorova S.A. Heat shock proteins in protein folding and reactivation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(1):7-14. doi 10.18699/vjgb-25-02

Введение

Белки теплового шока (молекулярные шапероны, heat shock proteins, HSP) – класс консервативных белков, основной функцией которых является контроль качества белков в клетках (van Leeuwen, Kampinga, 2018). Белки теплового шока были обнаружены у всех изученных про- и эукариот (Lindquist, 1986). Синтез множества представителей HSP осуществляется в нормальных условиях и усиливается в ответ на воздействие различных стрессоров, таких как повышенная и пониженная температура, гипоксия, окислительный стресс и присутствие инфекционных агентов (Sørensen et al., 2003; Kampinga et al., 2009; Sarkar et al., 2011). В нормальных условиях HSP обеспечивают правильную конформацию новосинтезированных пептидов, выполняя функцию «молекулярных шаперонов» (Ellis, 1987; Feder, Hofmann, 1999). Влияние неблагоприятных факторов среды проявляется на субклеточном уровне в изменении окислительно-восстановительного и водного баланса, что приводит к нарушению конформации белков (Jolly, Morimoto, 2000). Неправильно свернутые белки способны приобретать несвойственные им вредные для клетки функции и имеют тенденцию к формированию нерастворимых агрегатов (Jolly, Morimoto, 2000). Усиление синтеза белков теплового шока позволяет клеткам поддерживать гомеостаз за счет того, что молекулярные шапероны придают нативную конформацию поврежденным белкам, предотвращают их агрегацию и разрушают уже сформировавшиеся белковые агрегаты (Jolly, Morimoto, 2000). Мутации в ряде HSP у человека приводят к развитию миопатий, нейропатий, заболеваний хрусталика глаза и сетчатки (Macario et al., 2005; Kakkar et al., 2014).

На основании структуры и выполняемых функций белки теплового шока разделяют на пять основных семейств, названия которых отражают массу шаперонов (в кДа): Hsp100 (или Hsp110), Hsp90, Hsp70, Hsp60 и малые HSP с массой до 43 кДа (Sarkar et al., 2011; Bar-Lavan et al., 2016). Работе HSP помогают кошапероны Hsp40, Hsp10 и NEF, иногда выделяемые в отдельные семейства. Для семейств HSP человека в 2009 г. профессором H.H. Kampinga с сотрудниками была предложена стандартная номенклатура: HSPH (Hsp110), HSPC (Hsp90), HSPA (Hsp70), DNAJ (Hsp40), HSPB (малые HSP), и для семейства шаперонинов: HSPD/E (HSP60/HSP10) и CCT (TRiC) (Kampinga et al., 2009).

Семейство Hsp100

К белкам семейства Hsp100 (Clp у бактерий, HSPH у человека) относятся шапероны с молекулярной массой около 100–110 кДа, обладающие протеолитической активностью и способные разрушать белковые агрегаты (Sarkar et al., 2011; Mogk et al., 2015). Шапероны этого семейства широко распространены у прокариот, присутствуют у одноклеточных эукариот (к примеру, Hsp104 и Hsp78 у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*), у многоклеточных организмов обнаруживаются только в митохондриях (Sarkar et al., 2011). Hsp100 принадлежат к суперсемейству белков AAA+ (ATPases associated with diverse cellular activities) и обладают характерным доменом AAA длиной около 230 аминокислот, имеющим мотивы Walker A, Walker B, sensor-1 и sensor-2, необходимые для связывания и гидролиза нуклеотидов, а также для олигомеризации пептидов Hsp100 с образованием кольцеобразных структур (Mogk et al., 2015; Mokry et al., 2015). На основании количества доменов AAA шапероны семейства Hsp100 относят к одному из двух классов: первому (с двумя нуклеотид-связывающими доменами) или второму (с одним доменом AAA) (Hodson et al., 2012; Mokry et al., 2015). К первому классу относятся, например, ClpA, ClpB (Hsp104) и ClpC, ко второму – ClpX и HslU (Hodson et al., 2012).

У всех представителей семейства Hsp100 присутствует N-концевой домен, обеспечивающий их связывание с белковыми агрегатами (Mokry et al., 2015). У некоторых шаперонов Hsp100 присутствует M-домен, расположенный внутри первого нуклеотид-связывающего домена. Подвижные M-домены обращены наружу кольца Hsp100 и играют важную роль во взаимодействии с субстратом и реактивации агрегированных белков (Mokry et al., 2015). В присутствии АТФ Hsp100 объединяются в кольцеобразные гомогексамеры с центральной порой диаметром около 15 Å, через которую протягивается разворачиваемый субстрат – белок, находящийся в составе агрегата (Hodson et al., 2012; Duran et al., 2017). Внутрь канала обращены содержащие тирозин петли, связывающие гидрофобные участки агрегированных белков и проталкивающие субстрат сквозь пору в результате последовательного гребущего движения за счет гидролиза АТФ (Saibil, 2013). Субстрат вовлекается в пору Hsp100 не свободным концом, а петлей, так как внутренние сегменты агрегированных белков легче захватываются этими шаперонами (Avellaneda et al., 2020). Втягивание белка-субстрата в пору свободным концом, тем не менее, также возможно (Avellaneda et al., 2020).

Некоторые представители семейства Hsp100 ассоциированы с протеазами и по мере вытягивания субстрата из белкового агрегата транслоцируют его в протеазы для деградации (Hodson et al., 2012). К примеру, ClpA, ClpC и ClpX бактерий ассоциированы с протеазой ClpP, а шаперон HslU (ClpY) – с протеазой HslV (ClpQ) (Hodson et al., 2012). Шапероны ClpB бактерий, Hsp78 и Hsp104 дрожжей *S. cerevisiae* и Hsp101 растений не имеют связанных с ними протеаз и, таким образом, реактивируют агрегированные белки (Hodson et al., 2012).

Шапероны Hsp100 способны разрушать белковые агрегаты самостоятельно, однако эффективность их работы

значительно возрастает в присутствии системы шаперонов Hsp70/Hsp40/NEF (Mokry et al., 2015). Белки Hsp104 и ClpB практически не способны распознавать субстрат в отсутствие Hsp70 (Mogk et al., 2015). Шапероны Hsp70 присоединяются к пептидам в составе агрегатов и напрямую связываются с M-доменами Hsp100, предоставляя им субстрат, который продвигается в центральный канал Hsp100 и разворачивается (Mogk et al., 2015).

Семейство Hsp90

Белки семейства Hsp90 (HtpG у бактерий, HSPC у человека) являются одними из самых распространенных шаперонов, составляющих до 1–2 % от всех белков в клетках эукариот (Sarkar et al., 2011; Li, Buchner, 2013). Помимо фолдинга денатурированных белков, шапероны Hsp90 обеспечивают созревание множества новосинтезированных пептидов (Bar-Lavan et al., 2016). У бактерий имеется принадлежащий этому семейству белок, названный у *Escherichia coli* HtpG. У архей гены, кодирующие белки Hsp90, обнаружены не были (Li, Buchner, 2013). У дрожжей описаны два представителя семейства – Hsc82 и Hsp82, которые локализованы в цитозоле (Li, Buchner, 2013). В хлоропластах растений расположен ch-Hsp90 (Li, Buchner, 2013). Для плодовой мушки *Drosophila melanogaster* известен только один представитель семейства – Hsp83, ген которого является единственным среди генов *HSP* дрозофилы, в котором содержится интрон (Sarkar et al., 2011). У млекопитающих присутствуют четыре представителя Hsp90, из которых две изоформы Hsp90 (Hsp90α и Hsp90β) функционируют в цитозоле, Grp94 – в эндоплазматической сети, а Trap-1 – в митохондриях (Sarkar et al., 2011; Li, Buchner, 2013).

Hsp90 состоят из трех доменов: крайне консервативного N-концевого, который содержит АТФ-связывающий сайт и заряженный петлевой сегмент, M-домена, необходимого для связывания субстрата и регуляции гидролиза АТФ, и C-концевого, посредством которого осуществляется димеризация Hsp90 и взаимодействие с некоторыми кошаперонами (Bar-Lavan et al., 2016). В не связанном с АТФ состоянии гомодимер Hsp90 представляет собой V-образную структуру, называемую «открытой конформацией» (Li, Buchner, 2013). Связывание АТФ приводит к изменению ориентации доменов N и M и постепенному переходу гомодимера к «закрытой конформации» с димеризованными N-доменами (Li, Buchner, 2013). После гидролиза АТФ N-домены диссоциируют, и Hsp90 возвращается к «открытой конформации» (Li, Buchner, 2013). Переход между конформациями определяется взаимодействием с белками-клиентами и многочисленными кошаперонами Hsp90 (Li, Buchner, 2013; Bar-Lavan et al., 2016). Взаимодействие Hsp90 с кошаперонами и белком-субстратом происходит в «открытой конформации»; в процессе перехода гомодимера Hsp90 в «закрытую конформацию» происходит фолдинг субстрата; затем АДФ, фосфат, субстрат и кошапероны отсоединяются от Hsp90, и шаперон вновь приобретает «открытую конформацию» (Li, Buchner, 2013).

Регуляция кошаперонами является консервативной чертой системы Hsp90 эукариот. Сейчас известно более 20 кошаперонов Hsp90 (Li, Buchner, 2013). Они регулируют функционирование Hsp90 путем ингибирования и активации их АТФ-азной активности и привлечения специфических белков-клиентов. При этом различные кошапероны взаимодействуют друг с другом для облегчения созревания субстратов, и состав кошаперонных комплексов зависит от типа белка-клиента (Li, Buchner, 2013).

Функционально Hsp90 более специализированы по сравнению с другими белками теплового шока. Совместно со своими кошаперонами белки Hsp90 играют важную роль в фолдинге по крайней мере 200 различных пептидов в нормальных условиях, а также в рефолдинге денатурированных после стрессового воздействия белков (Sarkar et al., 2011; Saibil, 2013). К субстратам шаперонов семейства Hsp90 относятся сигнальные белки, участвующие в регуляции клеточного деления, киназы, рецепторы стероидных гормонов и супрессор опухолей p53 (Saibil, 2013).

Семейство Hsp70

Представители семейства Hsp70 (DnaK у прокариот, HSPA у человека) имеют молекулярную массу около 70 кДа и являются самыми консервативными из белков теплового шока. Последовательность их аминокислот совпадает приблизительно на 50 % у всех охарактеризованных видов живых организмов (Sarkar et al., 2011; Bar-Lavan et al., 2016). Отличительная черта их генов – наличие множества копий у большинства изученных видов (Sarkar et al., 2011). Так, у дрожжей *S. cerevisiae* присутствует 14 копий *Hsp70* (Sarkar et al., 2011); у *D. melanogaster* – 6 практически идентичных стресс-индуцируемых генов *Hsp70*, стресс-индуцируемый ген *Hsp68* и несколько экспрессирующихся на постоянной основе генов *Hsc70* (Heat shock cognate 70) (Tower, 2011; Xiao et al., 2019). У человека обнаружено 17 генов и 30 псевдогенов, кодирующих шапероны Hsp70, некоторые из которых имеют гомологию последовательностей до 90 % (Brocchieri et al., 2008; Radons, 2016).

У архей и эубактерий белки Hsp70 располагаются в цитозоле, у эукариот – в ядре, цитоплазме, митохондриях, хлоропластах и эндоплазматической сети (Sarkar et al., 2011; Rosenzweig et al., 2019). К их функциям относятся фолдинг полипептидов и высвобождение белков из агрегатов, поддержание склонных к агрегации белков в развернутом виде и участие в транслокации белков через мембраны органелл (Saibil, 2013; Bar-Lavan et al., 2016).

Шапероны Hsp70 состоят из консервативного N-концевого нуклеотид-связывающего домена массой около 44 кДа и менее консервативного субстрат-связывающего домена массой около 30 кДа, соединенных коротким консервативным гидрофобным линкером (Sarkar et al., 2011; Bar-Lavan et al., 2016; Larburu et al., 2020). Неструктурированный C-концевой участок Hsp70 имеет варьирующую длину. У расположенных в ядре и цитоплазме эукариот шаперонов Hsp70 этот участок часто содержит отрицательно заряженный мотив Glu-Glu-Val-Asp, который взаимодействует со специфическими кофакторами, включая кошапероны Hsp40 (Rosenzweig et al., 2019). Нуклеотид-связывающий домен состоит из четырех субдоменов, формирующих две доли с глубокой щелью между ними, в которой расположен каталитический центр, связывающий АТФ (Rosenzweig et al., 2019). Субстрат-связываю-

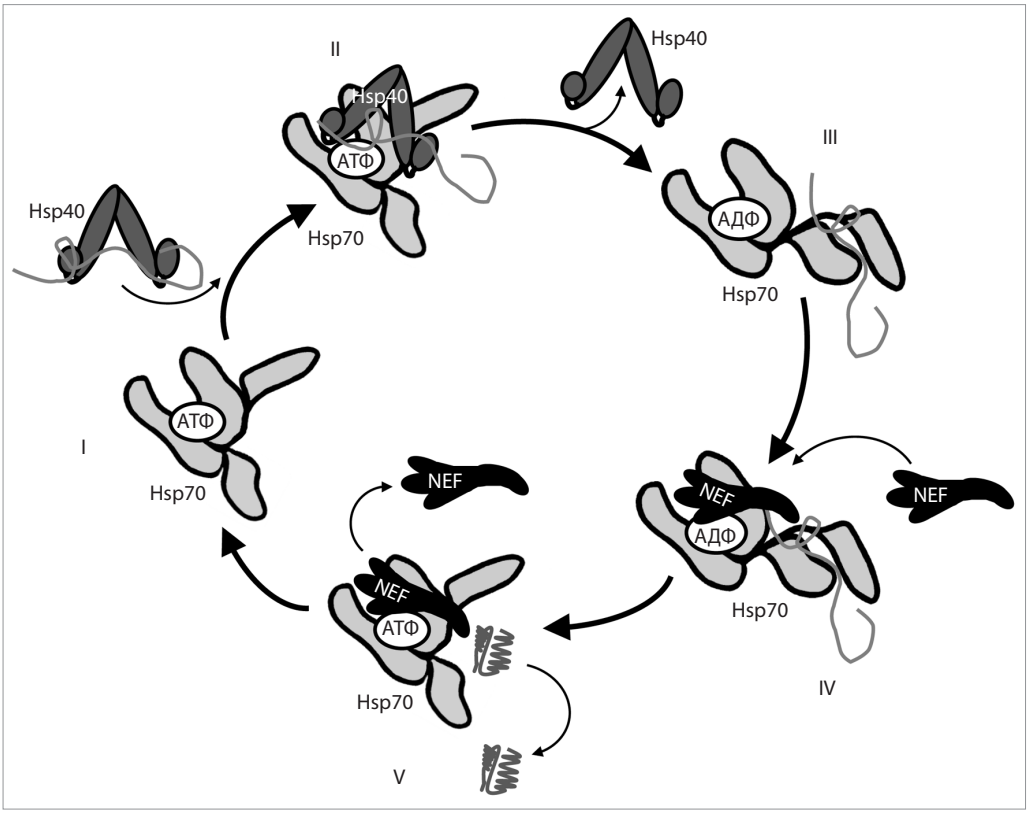

Рис. 1. Реакционный цикл шаперона Hsp70.

I – в присутствии АТФ в нуклеотид-связывающем домене Hsp70 белок-связывающий карман шаперона открыт и способен взаимодействовать с неправильно свернутыми белками. II – кошаперон Hsp40 подает белок-субстрат и способствует гидролизу АТФ в нуклеотид-связывающем домене Hsp70. III – гидролиз АТФ приводит к изменению конформации Hsp70, в результате чего субъединицы субстрат-связывающего домена отделяются от нуклеотид-связывающего домена и закрываются, зажимая белок-субстрат. IV – кошаперон NEF обменивает АДФ в нуклеотид-связывающем домене Hsp70 на АТФ. V – белок-связывающий карман Hsp70 открывается, высвобождая ренатурированный субстрат.

щий домен включает два субдомена – α и β (Larburu et al., 2020). Субдомен β состоит из β-складок и содержит гидрофобный карман, связывающий белки-субстраты. Субдомен α представлен α-спиралями и служит «крышкой», закрывающей белок-связывающий карман (Larburu et al., 2020).

Связывание и высвобождение субстрата регулируется присоединением и гидролизом АТФ, а скорость – кошаперонами Hsp40 (DnaJ у прокариот) и NEF (nucleotide exchange factor; GrpE у бактерий) (Saibil, 2013; Larburu et al., 2020). Реакционный цикл шаперона Hsp70 и его кошаперонов представлен на рис. 1. Присоединение молекулы АТФ к каталитическому центру нуклеотид-связывающего домена Hsp70 вызывает вращение долей нуклеотид-связывающего домена, в результате которого междоменный линкер и субдомены субстрат-связывающего домена прикрепляются к нуклеотид-связывающему домену, открывая карман для белка-субстрата (Rosenzweig et al., 2019). Субстрат-связывающий домен взаимодействует с коротким мотивом белка-субстрата, содержащим пять гидрофобных аминокислотных остатков, фланкированных заряженными аминокислотными остатками (Larburu et al., 2020). Этот мотив присутствует почти у всех белков, что обеспечивает гибкость в выборе субстрата шаперонами Hsp70 (Larburu et al., 2020).

Присоединение белка-субстрата вызывает гидролиз АТФ, в результате чего междоменный линкер и субдомены субстрат-связывающего домена отсоединяются от нуклеотид-связывающего домена, а субдомен α субстрат-связывающего домена закрывает субстрат-связывающий карман, запирая в нем белок-клиент (Rosenzweig et al., 2019; Larburu et al., 2020). Обычно гидролиз АТФ в каталитическом центре Hsp70 происходит со скоростью 1 молекула в 20–30 мин, однако присоединение к Hsp70 кошаперона Hsp40 вместе с субстратом ускоряет этот процесс более чем в 1000 раз (Bar-Lavan et al., 2016; Larburu et al., 2020). Замену АДФ на АТФ катализирует кошаперон NEF (Bar-Lavan et al., 2016). Этот процесс приводит к открыванию кармана с субстратом и его высвобождению (см. рис. 1) (Larburu et al., 2020).

Существуют разные гипотезы о том, как Hsp70 осуществляет фолдинг белков. В некоторых моделях связывание шаперонами Hsp70 гидрофобных участков денатурированных белков защищает их от агрегации, и в последующем освобожденный субстрат самостоятельно принимает правильную конформацию (Bar-Lavan et al., 2016). Другие модели предполагают, что «зажимание» денатурированных белков в субстрат-связывающем кармане одного или нескольких Hsp70 способствует их разворачиванию (Bar-Lavan et al., 2016). Поскольку шапероны Hsp70 не только

предотвращают агрегацию и способствуют фолдингу полипептидов, но и реактивируют агрегированные белки, более правдоподобными могут быть модели, указывающие главной функцией Hsp70 разворачивание белков (Bar-Lavan et al., 2016).

Семейство Hsp60

Белки семейства Hsp60 (GroEL у эубактерий, HSPD у человека), также называемые шаперонинами (Hemmingsen, 1992), необходимы большинству организмов не только при воздействии стресса, но и в нормальных условиях (Sarkar et al., 2011; Fan et al., 2020). В отличие от шаперонов Hsp70 и Hsp100, в основном исправляющих конформацию денатурированных белков и разрушающих белковые агрегаты, Hsp60 в первую очередь задействованы на ранних этапах фолдинга пептидов (Saibil, 2013). Известно, что около 30 % всех новосинтезированных пептидов *E. coli* приобретают правильную конформацию благодаря GroEL (Koumoto et al., 2001).

Последовательность ДНК шаперонинов Hsp60 крайне консервативна, что позволяет использовать ее для филогенетического анализа и идентификации организмов (Sarkar et al., 2011). На основании схожести последовательностей генов Hsp60 и строения шаперонины делят на две группы (Saibil, 2013; Bar-Lavan et al., 2016). К группе I относят GroEL бактерий и его кошаперон GroES, Hsp60 митохондрий и его кошаперон Hsp10, Cpn60 хлоропластов с кошапероном Cpn20 (Sarkar et al., 2011; Saibil, 2013; Zhang et al., 2016). Группа II включает термосому архей и цитоплазматический белок CCT (chaperonin-containing TCP1, также известный как TriC) эукариот (Saibil, 2013). Шаперонины представляют собой симметричные структуры из двух колец, состоящих из 7 (группа I) или 8–9 (группа II) мономеров массой около 60 кДа (Lopez et al., 2015). Мономеры Hsp60 обеих групп имеют три домена: апикальный, экваториальный и промежуточный. Экваториальный домен содержит АТФ-связывающие сайты и участки, необходимые для взаимодействия колец; апикальный обеспечивает связывание субстрата, а у шаперонинов группы I – также взаимодействие с кошаперонами Hsp10 (Sarkar et al., 2011; Saibil, 2013; Bar-Lavan et al., 2016).

Кошапероны Hsp10 представляют собой гомогептамеры, состоящие из субъединиц массой около 10 кДа, которые присоединяются к кольцам шаперонинов группы I, закрывая их полости подобно крышке (Saibil, 2013). Функцию кошаперонов Hsp10 у шаперонинов группы II выполняет дополнительный участок апикального домена (Saibil, 2013). Промежуточный домен мономеров Hsp60 связывает между собой апикальный и экваториальный домены и изменяет конформацию при связывании АТФ, что способствует переключению между «открытым» состоянием, при котором внутренняя поверхность полости, образованной кольцом Hsp60, гидрофобна, и «закрытым», при котором внутренняя поверхность гидрофильна (Sarkar et al., 2011; Saibil, 2013; Bar-Lavan et al., 2016).

Реакционный цикл шаперонинов группы I GroEL/GroES описан на рис. 2. Цикл фолдинга белков шаперонинами группы II происходит по схожей схеме, за следующими исключениями: закрытие камеры Hsp60 осуществляется не кошапероном, а дополнительными участками апикальных доменов мономеров Hsp60 в результате гидролиза АТФ; кольца шаперонинов группы II меняют состояние между «открытым» и «закрытым» синхронно, а не последовательно (Kumar et al., 2015; Lopez et al., 2015).

Субстратами Hsp60 являются пептиды молекулярной массой от 35 до 60 кДа. Максимальный размер субстрата определяется объемом полости колец Hsp60, который у GroEL составляет ~175000 Å^3 (Bar-Lavan et al., 2016). Шаперонины производят фолдинг важнейших для клеток белков, таких как актин и тубулин эукариот и субъединица RbcL фермента RuBisCO, являющегося участником цикла Кальвина (Sarkar et al., 2011; Hayer-Hartl, 2017).

Семейство малых HSP

Малые белки теплового шока (HSPB у человека) имеют массу от 12 до 43 кДа (Sarkar et al., 2011). У эукариот они встречаются в цитоплазме, ядре, митохондриях, хлоропластах и пероксисомах. Прокариоты и одноклеточные эукариоты обычно имеют один или два цитозольных малых HSP, однако у некоторых бактерий их может быть несколько. К примеру, у бактерий рода *Bradyrhizobium* может насчитываться до 8 генов малых HSP (Mogk et al., 2019).У многоклеточных эукариот количество генов, кодирующих малые HSP, варьирует от 10 у человека до 50 у высших растений (Mogk et al., 2019).

В отличие от представителей других семейств, малые белки теплового шока не обладают способностью к рефолдингу денатурированных и агрегированных белков и не осуществляют гидролиз АТФ при выполнении своих функций, основная из которых – предотвращение агрегации несвернутых и денатурированных белков (Bar-Lavan et al., 2016; Mogk et al., 2019). Помимо предотвращения агрегации белков, малые HSP вовлечены в ряд ключевых физиологических процессов, таких как клеточная дифференцировка и апоптоз (Fu, 2015).

Характерным признаком представителей семейства малых белков теплового шока является наличие консервативного α-кристаллинового домена, название которого произошло от белка хрусталика глаза позвоночных – α-кристаллина (Sarkar et al., 2011; Bar-Lavan et al., 2016; Paul et al., 2016; Mogk et al., 2019). Этот домен состоит из 90–100 аминокислотных остатков, формирующих β-сэндвич, содержащий 7–8 антипараллельных β-листов (Mogk et al., 2019). α-Кристаллиновый домен малых HSP окружен менее консервативными N- и C-концевыми доменами (Mogk et al., 2019). N-концевые домены особенно разнообразны по аминокислотному составу и длине и состоят из 24–247 аминокислотных остатков (в среднем из 56) (Mogk et al., 2019). C-концевые домены состоят менее чем из 20 аминокислотных остатков (в среднем из 10) и в 90 % случаев содержат консервативный мотив Ile-X-Ile/Val (IXI/V), играющий ключевую роль в олигомеризации малых HSP (Saji et al., 2008; Mogk et al., 2019).

Полые и сферические олигомеры малых HSP включают 12–32 протомера (Saji et al., 2008; Mogk et al., 2019). Протомеры являются димерами малых HSP, а олигомеры могут быть представлены как одним видом малых HSP, так и несколькими (Mogk et al., 2019). Димеризация малых HSP происходит за счет взаимодействия α-кри-

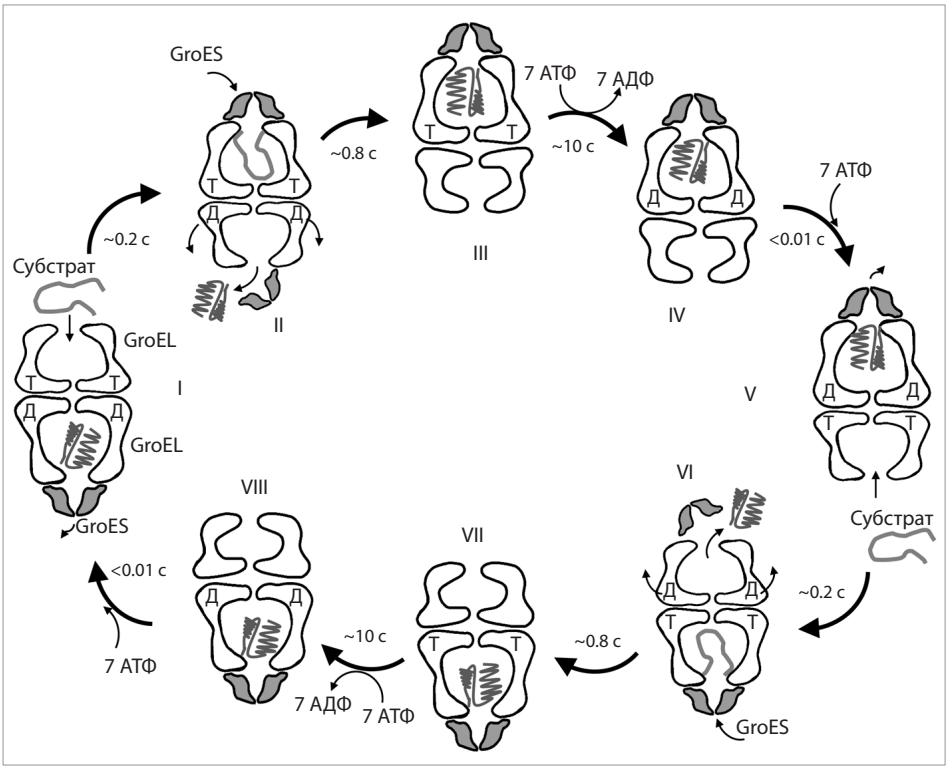

Рис. 2. Реакционный цикл Hsp60 на примере бактериального GroEL и его кошаперона GroES (гомогептамеры GroEL и GroES изображены в разрезе).

I – белок-субстрат с нарушенной конформацией взаимодействует своими гидрофобными участками с гидрофобной внутренней поверхностью апикальных доменов присоединившего АТФ открытого кольца GroEL. II – полость GroEL очень быстро (в течение ~0.2 с (Horwich, 2011)) закрывается кошапероном GroES, и субстрат оказывается «запертым» в полости GroEL. III – присоединение GroES вызывает поворот апикальных доменов GroEL на 100° по часовой стрелке (Horwich, 2011; Clare et al., 2012), в результате которого внутренняя поверхность кольца GroEL становится гидрофильной, что способствует фолдингу субстрата. IV – приблизительно через 10 с происходит гидролиз АТФ в экваториальных доменах кольца с субстратом, что приводит к ослаблению связи между двумя кольцами, благодаря чему второе кольцо становится способным связать АТФ и начать цикл фолдинга (Horwich, 2011). V – кошаперон GroES отсоединяется от первого кольца GroEL; во втором кольце начинается цикл фолдинга нового белка-субстрата. VI – правильно свернутый (или все еще не свернутый) субстрат покидает открывшуюся полость первого кольца; от экваториальных доменов первого кольца GroEL отсоединяются АДФ и фосфат. VII, VIII – первое кольцо не способно связывать АТФ и, соответственно, белок-субстрат, до тех пор, пока не произойдет гидролиз АТФ во втором кольце. Т – АТФ, Д – АДФ.

сталлиновых доменов, а олигомеризация – за счет элементов N- и C-концевых доменов (Mogk et al., 2019). Олигомеры малых HSP динамичны и постоянно обмениваются димерами (Żwirowski et al., 2017). Во время воздействия стрессовых факторов (например, изменения температуры, концентрации солей и pH) равновесие смещается в сторону формирования меньших олигомеров и распада на димеры, которые связываются с гидрофобными участками денатурированных белков (Żwirowski et al., 2017; Mogk et al., 2019).

Малые HSP обладают малой специфичностью и взаимодействуют с широким спектром различных белков-субстратов (Mogk et al., 2019). Связываясь с субстратами, малые HSP образуют с ними комплексы, состоящие из двух слоев: стабильного ядра, в состав которого входят малые HSP и неподвижные белки-субстраты, и динамичной оболочки из малых HSP, которые то связываются с комплексом, то отделяются от него (рис. 3) (Żwirowski et al., 2017). Размеры таких комплексов меньше, чем у сформированных денатурированными белками агрегатов, однако их молекулярная масса обычно превышает 1 МДа (Żwirowski et al., 2017).

Размеры комплексов малых HSP с субстратами зависят от количественного соотношения малых HSP и белков-субстратов в них: чем выше доля малых HSP, тем меньше размеры комплексов; при достаточно высоком содержании малых HSP комплексы становятся растворимыми (Mogk et al., 2019). При небольшом содержании малых HSP субстраты формируют плотные нерастворимые комплексы, но в отличие от нерастворимых агрегатов, образованных исключительно денатурированными белками, субстраты поддерживаются в конформации, позволяющей шаперонам других семейств извлечь их из комплекса и произвести их реактивацию путем фолдинга (Mogk et al., 2019).

Реактивацию денатурированных белков, входящих в состав комплексов с малыми HSP, осуществляют шапероны Hsp70 (см. рис. 3) (Żwirowski et al., 2017). Путем конкурентного связывания субстрата Hsp70 вытесняют малые HSP из оболочки комплексов и производят фолдинг субстрата, иногда совместно с Hsp100 (Żwirowski et al., 2017).

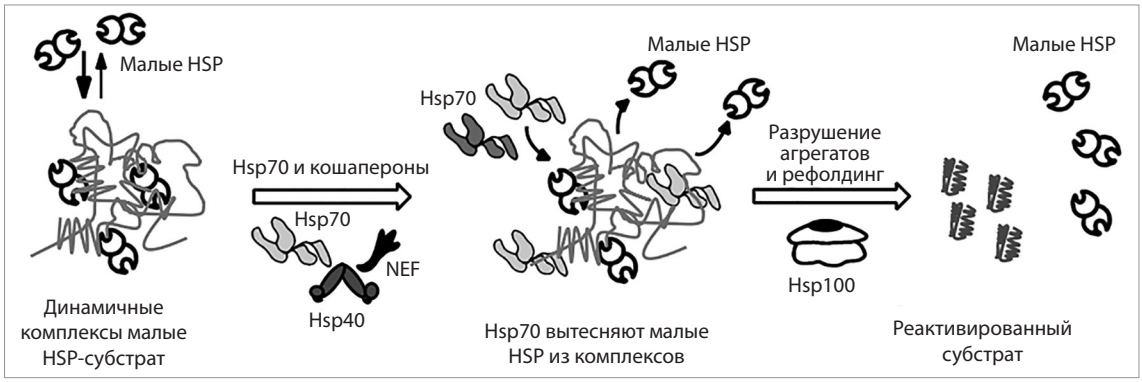

Рис. 3. Схема процесса высвобождения малых белков теплового шока из комплексов с белками-субстратами шаперонами Hsp70 и реактивации белков-субстратов шаперонами Hsp70 и Hsp100.

Комплексы малых HSP с субстратом состоят из стабильного ядра, представленного денатурированными белками и связанными с ними малыми HSP, и динамичной оболочки, на поверхности которой происходит присоединение малых HSP к комплексу и диссоциация из него (равновесие смещено в сторону присоединения). Шапероны Hsp70 вытесняют малые HSP из комплексов, высвобождая их, затем подают белки-субстраты шаперонам Hsp100, которые протягивают их через центральную пору и реактивируют.

Оболочка комплексов несет несколько важных физиологических функций: поддерживает размер и растворимость комплекса благодаря защите гидрофобных участков белков-субстратов от взаимодействия с другими денатурированными белками, предотвращая таким образом их агрегацию; образует селективный барьер, проницаемый лишь для шаперонов Hsp70; увеличивает потребность в шаперонах Hsp70 по сравнению с белковыми агрегатами (Żwirowski et al., 2017).

Таким образом, несмотря на то что малые HSP поддерживают склонные к агрегации белки в удобном для фолдинга состоянии, они замедляют реактивацию субстрата при недостаточных концентрациях Hsp70. Возможно, такой механизм действия позволяет изолировать денатурированные белки в неблагоприятных условиях, когда количество доступных шаперонов Hsp70 ограничено, к примеру при хроническом стрессе (Żwirowski et al., 2017). В то же время при низких концентрациях Hsp70 малые HSP могут способствовать формированию белковых агрегатов, так как они предотвращают убиквитинирование субстрата в комплексе и его деградацию (Mogk et al., 2019).

Заключение

Являясь молекулярными шаперонами, белки теплового шока играют центральную роль в белковом гомеостазе и жизненно необходимы для всех известных про- и эукариот. Представители разных семейств HSP выполняют различные функции: помогают придавать правильную конформацию полипептидам, предотвращают агрегацию денатурированных белков, осуществляют их рефолдинг или способствуют их деградации. Для выполнения всех этих функций молекулярные шапероны работают в тандеме друг с другом и с многочисленными кошаперонами, поддерживая протеом клетки в рабочем состоянии. Таким образом, белки теплового шока служат «первой линией защиты» клеток от токсичного воздействия поврежденных и несвернутых белков как при нормальном функционировании клетки, так и при влиянии различных стрессовых факторов.

Список литературы / References

Avellaneda M.J., Franke K.B., Sunderlikova V., Bukau B., Mogk A., Tans S.J. Processive extrusion of polypeptide loops by a Hsp100 disaggregase. *Nature*. 2020;578(7794):317-320. doi 10.1038/s41586-020-1964-y

Bar-Lavan Y., Shemesh N., Ben-Zvi A. Chaperone families and interactions in metazoa. *Essays Biochem.* 2016;60(2):237-253. doi 10.1042/EBC20160004

Brocchieri L., Conway de Macario E., Macario A.J. Hsp70 genes in the human genome: conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evol Biol.* 2008;8(1):19. doi 10.1186/1471-2148-8-19

Clare D.K., Vasishtan D., Stagg S., Quispe J., Farr G.W., Topf M., Horwich A.L., Saibil H.R. ATP-triggered conformational changes delineate substrate-binding and -folding mechanics of the GroEL chaperonin. *Cell*. 2012;149(1):113-123. doi 10.1016/j.cell.2012.02.047

Duran E.C., Weaver C.L., Lucius A.L. Comparative analysis of the structure and function of AAA+ motors ClpA, ClpB, and Hsp104: common threads and disparate functions. *Front Mol Biosci.* 2017;4:54. doi 10.3389/fmolb.2017.00054

Ellis J. Proteins as molecular chaperones. *Nature*. 1987;328(6129):378-379. doi 10.1038/328378a0

Fan F., Duan Y., Yang F., Trexler C., Wang H., Huang L., Li Y., Tang H., Wang G., Fang X., Liu J., Jia N., Chen J., Ouyang K. Deletion of heat shock protein 60 in adult mouse cardiomyocytes perturbs mitochondrial protein homeostasis and causes heart failure. *Cell Death Differ.* 2020;27(2):587-600. doi 10.1038/s41418-019-0374-x

Feder M.E., Hofmann G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol.* 1999;61(1):243-282. doi 10.1146/annurev.physiol.61.1.243

Fu X. Insights into how small heat shock proteins bind a great diversity of substrate proteins: a super-transformer model. In: Tanguay R.M., Hightower L.E. (Eds) The Big Book on Small Heat Shock Proteins. Cham: Springer Int. Pub., 2015;107-117. doi 10.1007/978-3-319-16077-1_4

Hayer-Hartl M. From chaperonins to Rubisco assembly and metabolic repair. *Protein Sci.* 2017;26(12):2324-2333. doi 10.1002/pro.3309

Hemmingsen S.M. What is a chaperonin? *Nature*. 1992;357(6380):650-650. doi 10.1038/357650b0

Hodson S., Marshall J.J.T., Burston S.G. Mapping the road to recovery: the ClpB/Hsp104 molecular chaperone. *J Struct Biol.* 2012;179(2):161-171. doi 10.1016/j.jsb.2012.05.015

Horwich A.L. Protein folding in the cell: an inside story. *Nat Med.* 2011;17(10):1211-1216. doi 10.1038/nm.2468

Jolly C., Morimoto R.I. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(19):1564-1572. doi 10.1093/jnci/92.19.1564

Kakkar V., Meister-Broekema M., Minoia M., Carra S., Kampinga H.H. Barcoding heat shock proteins to human diseases: looking beyond the heat shock response. *Dis Model Mech.* 2014;7(4):421-434. doi 10.1242/dmm.014563

Kampinga H.H., Hageman J., Vos M.J., Kubota H., Tanguay R.M., Bruford E.A., Cheetham M.E., Chen B., Hightower L.E. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*. 2009;14(1):105-111. doi 10.1007/s12192-008-0068-7

Koumoto Y., Shimada T., Kondo M., Hara-Nishimura I., Nishimura M. Chloroplasts have a novel Cpn10 in addition to Cpn20 as co-chaperonins in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* 2001;276(32): 29688-29694. doi 10.1074/jbc.M102330200

Kumar C.M.S., Mande S.C., Mahajan G. Multiple chaperonins in bacteria-novel functions and non-canonical behaviors. *Cell Stress Chaperones*. 2015;20(4):555-574. doi 10.1007/s12192-015-0598-8

Larburu N., Adams C.J., Chen C.-S., Nowak P.R., Ali M.M.U. Mechanism of Hsp70 specialized interactions in protein translocation and the unfolded protein response. *Open Biol.* 2020;10(8):200089. doi 10.1098/rsob.200089

Li J., Buchner J. Structure, function and regulation of the Hsp90 machinery. *Biomed J.* 2013;36(3):106-117. doi 10.4103/2319-4170.113230

Lindquist S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem.* 1986;55(1): 1151-1191. doi 10.1146/annurev.bi.55.070186.005443

Lopez T., Dalton K., Frydman J. The mechanism and function of group II chaperonins. *J Mol Biol.* 2015;427(18):2919-2930. doi 10.1016/ j.jmb.2015.04.013

Macario A.J.L., Grippo T.M., de Macario E.C. Genetic disorders involving molecular-chaperone genes: a perspective. *Genet Med.* 2005;7(1):3-12. doi 10.1097/01.GIM.0000151351.11876.C3

Mogk A., Kummer E., Bukau B. Cooperation of Hsp70 and Hsp100 chaperone machines in protein disaggregation. *Front Mol Biosci.* 2015;2:22. doi 10.3389/fmolb.2015.00022

Mogk A., Ruger-Herreros C., Bukau B. Cellular functions and mechanisms of action of small heat shock proteins. *Annu Rev Microbiol.* 2019;73(1):89-110. doi 10.1146/annurev-micro-020518-115515

Mokry D.Z., Abrahão J., Ramos C.H.I. Disaggregases, molecular chaperones that resolubilize protein aggregates. *An Acad Bras Cienc.* 2015;87(2 suppl):1273-1292. doi 10.1590/0001-3765201520140671

Paul A., Rao S., Mathur S. The α-crystallin domain containing genes: identification, phylogeny and expression profiling in abiotic stress, phytohormone response and development in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Front Plant Sci.* 2016;7:426. doi 10.3389/fpls.2016.00426

Radons J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones*. 2016;21(3):379-404. doi 10.1007/s12192-016-0676-6

Rosenzweig R., Nillegoda N.B., Mayer M.P., Bukau B. The Hsp70 chaperone network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(11):665-680. doi 10.1038/s41580-019-0133-3

Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(10):630-642. doi 10.1038/nrm3658

Saji H., Iizuka R., Yoshida T., Abe T., Kidokoro S., Ishii N., Yohda M. Role of the IXI/V motif in oligomer assembly and function of StHsp14.0, a small heat shock protein from the acidothermophilic archaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *Proteins Struct Funct Bioinform.* 2008;71(2):771-782. doi 10.1002/prot.21762

Sarkar S., Singh M.D., Yadav R., Arunkumar K.P., Pittman G.W. Heat shock proteins: molecules with assorted functions. *Front Biol* (*Beijing*). 2011;6(4):312. doi 10.1007/s11515-011-1080-3

Sørensen J.G., Kristensen T.N., Loeschcke V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol Lett.* 2003;6(11):1025-1037. doi 10.1046/j.1461-0248.2003.00528

Tower J. Heat shock proteins and *Drosophila* aging. *Exp Gerontol.* 2011;46(5):355-362. doi 10.1016/j.exger.2010.09.002

van Leeuwen F.W., Kampinga H.H. Heat shock proteins and protein quality control in Alzheimer's disease. In: Wolfe M.S. (Ed.) The Molecular and Cellular Basis of Neurodegenerative Diseases. Academic Press, 2018;269-298. doi 10.1016/B978-0-12-811304-2.00010-9

Xiao C., Hull D., Qiu S., Yeung J., Zheng J., Barwell T., Robertson R.M., Seroude L. Expression of heat shock protein 70 is insufficient to extend *Drosophila melanogaster* longevity. *G3* (*Bethesda*). 2019;9(12):4197-4207. doi 10.1534/g3.119.400782

Zhang S., Zhou H., Yu F., Bai C., Zhao Q., He J., Liu C. Structural insight into the cooperation of chloroplast chaperonin subunits. *BMC Biol.* 2016;14(1):29. doi 10.1186/s12915-016-0251-8

Żwirowski S., Kłosowska A., Obuchowski I., Nillegoda N.B., Piróg A., Ziętkiewicz S., Bukau B., Mogk A., Liberek K. Hsp70 displaces small heat shock proteins from aggregates to initiate protein refolding. *EMBO J.* 2017;36(6):783-796. doi 10.15252/embj.201593378

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 11.07.2024. После доработки 22.09.2024. Принята к публикации 10.10.2024.