

УДК 577.2

## БЕЛКИ ТЕПЛОВОГО ШОКА И ИХ РОЛЬ В ПОДДЕРЖАНИИ ГОМЕОСТАЗА РАСТЕНИЙ

Комарова Д.И.<sup>1</sup>, Мусабаева Г.К.<sup>2</sup>

[damira2405@mail.ru](mailto:damira2405@mail.ru)<sup>1</sup>, [guldenaym1997@mail.ru](mailto:guldenaym1997@mail.ru)<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup> Магистранты 1 курса факультета естественных наук Евразийского национального университета им. Л.Н. Гумилева, Нұр-Сұлтан, Қазақстан

Научный руководитель – Масалимов Ж.К., к.б.н., и.о. доцента

Белки теплового шока (*Heat Shock Proteins* – *HSPs*) являются молекулярные шаперонами, которые повсеместно распространены в клеточной среде и действуют как защитный механизм от внешней среды. HSPs экспрессируются посредством различных клеточных стрессов, в том числе тепловой шок [1], применение химиотерапевтических средств [2], ультрафиолетовое облучение [3], экспансия тринуклеотидного повтора [4] и воздействие TNF-фактора (*Tumor necrosis factor* – *фактор некроза опухолей*) [5,6].

Многофункциональность HSPs была выделена как надежный маркер для терапевтических целей в исследованиях нервно-мышечных и раковых заболеваний. HSPs также играют важную роль в поддержании белков и клеточного гомеостаза при адаптации, которая вызвана высокой нагрузкой при стрессе. Такие функции HSPs дают возможность использовать белки-шапероны для изучения механизмов защиты в живых организмах.

Основная способность HSPs поддерживать выживание клеток связана торможением процесса активации каспазы и апоптоза, которые не редко связаны с шаперонной активностью HSPs [7].

Представители семейства HSPs контролируют сворачивание, сборку, транслокацию и деградацию белков в стрессовых условиях и во многих нормальных клеточных процессах. В целом поддержание белков в их функциональных нативных конформациях и предотвращение агрегации ненативных белков имеют важное значение для выживания клеток в условиях стресса.

HSPs широко классифицируются в соответствии с их размерами и включает в себя шесть основных семейств: sHSP, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100. Семейства HSPs состоят из молекулярных размеров от 10 до более чем 100 кДа и расположены в различных клеточных

органеллах. В зависимости от размеров изменяются места локализации и физиологические роли молекулярных шаперонов в клетках.

1 семейство - малые HSPs (sHSPs) - представляют собой очень разнообразную группу шаперонов, которые играют важную роль в поддержании контроля качества белка в клетке. Их разнообразие распространяется на молекулярные массы, которые варьируются от 16 кДа у *C. Elegans* до 40 кДа у простейших *S. Mansoni*. Данные белки также резко вырабатываются растениями в ответ на температурный стресс. Они функционируют в основном для обеспечения термозащиты клеток и стимулирования термотолерантности в растениях.

Большинство sHSPs имеют некоторые общие черты, такие как: наличие консервативного домена  $\alpha$ -кристаллина из ~ 90 остатков, небольшая молекулярная масса 12-43 кДа, образование крупных олигомеров, динамическая четвертичная структура и индукция за счет стрессовые условия и активность шаперона в подавлении агрегации белков [8].



Рисунок 1. Доменная организация sHSPs

HSP размером 15–30 кДа связаны с sHSP, и известно, что у млекопитающих существует 9 sHSP. А именно: Hsp27 (обозначается Hsp25 у мышей),  $\alpha$ A- и  $\alpha$ B-кристаллины, Hsp20, HspB2, HspB3, cvHsp или HspB7, Hsp22 или HspB8 и HspB9. Человеческий sHSP имеет 105–205 аминокислот и домен  $\alpha$ -кристаллина в виде 80 гомологичных секвенированных остатков. Этот домен демонстрирует высококонсервативную структуру и 38-60% аминокислотной идентичности [9].

Одной из наиболее характерных черт sHSPs является их способность организовываться в виде больших олигомерных структур. Структуры членов пяти семейств sHSPs были определены с помощью рентгеновской кристаллографии или электронной микроскопии. Внешний диаметр колеблется от 100 до 180 Å. HSP16.5 из *Methanocaldococcus jannaschii*, HSP16.3 (ACR1) из *Mycobacterium tuberculosis* и HSP26 из *Saccharomyces cerevisiae* образуют полые шарообразные структуры. Однако количество субъединиц в олигомерах варьируется. Например, комплексы HSP16.5 *Methanococcus Jannaschii* и дрожжевого HSP26 имеют 24 субъединицы, тогда как HSP16.3 *Mycobacterium Tuberculosis* имеет 12 субъединиц. Напротив, HSP16.9 пшеницы представляет собой бочкообразную структуру, собранную из двух гексамерных двойных дисков, в общей сложности 12 субъединиц [10].

2 семейство – HSP40 - является критически важным фактором функционирования HSP70. Эти белки 40 кДа повсеместно экспрессируются во всех организмах, от бактерий до высших эукариот. Семейство HSP40 довольно разнообразно и варьируется от 116 аминокислот DnaJC19 до 2243 аминокислот DnaJC13. В зависимости от физиологической сложности организмов присутствие HSP40 варьируется от 22 у дрожжей до 44 у человека. Очевидно, что количество HSP40 в клетке намного превышает количество Hsp70. Например, в клетке млекопитающего всего 11 HSP70, но 41 HSP40 [11]. Кроме того, HSP40 также демонстрируют гораздо более высокую последовательность и структурную дивергенцию, чем HSP70 в клетке. Это согласуется с идеей, что семейство HSP40 эволюционировало, чтобы способствовать универсальности и многофункциональности шаперонной системы HSP70.

Все HSP40 характеризуются наличием канонического J-домена и, следовательно, также называются J-белками. J-домен представляет собой область сигнатуры  $\alpha$ -спирали

приблизительно из 70 аминокислот, которая имеет свою номенклатуру после ко-шаперона HSP70 из *E. Coli* – DnaJ [12].

Структура J-домена сохраняется во всех царствах. Даже сильно различающиеся J-белки у разных видов сохраняют замечательное сходство трехмерных структурных складок в области J-домена. Он состоит из четырех спиралей с плотно упакованными спиральями II и III в антипараллельной ориентации. Обе эти спирали соединены гибкой петлей, содержащей высококонсервативный и функционально критический сигнатурный мотив HPD, который характерен для J-домена. Трипептид HPD необходим для стимуляции АТФ-азной активности HSP70 [13,14].

Этот J-домен очень похож на большинство J-белков, даже если они сильно различаются между видами. Помимо J-домена, HSP40 могут содержать «область G / F», «домен цинкового пальца» и варибельный «С-концевой домен» (рисунок 4). Область G / F представляет собой линкер, богатый глицином/фенилаланином, который разделяет J-домен. Это необходимо для стабильности и точного позиционирования J-домена во время его взаимодействия с HSP70 [11,12].

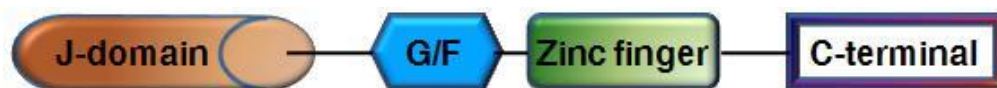


Рисунок 4. Доменная организация HSP40/J-белка

Цинк-связывающая богатая цистеином последовательность, называемая «домен цинкового пальца», содержит четыре повтора CXXCXGXXG, присутствующих в двух отдельных кластерах, где каждый кластер координируется с ионом цинка. Этот домен имеет решающее значение для секвестрации (отторжения) денатурированного субстрата и оказания помощи HSP70 во время реакции сворачивания белка [14]. С-концевой участок менее консервативен и состоит из  $\beta$ -сэндвича, окруженного короткой С-концевой  $\alpha$ -спиралью, за которой следуют последовательности, необходимые для димеризации.

На основе доменной организации J-белки подразделяются на 4 типа, а именно: Тип I, Тип II, Тип III и Тип IV. J-белки типа I обнаруживают присутствие всех доменов, обнаруженных в DnaJ [12].

3 семейство - семейство шаперонов или шаперонинов HSP60 (58-65 кДа) - является ключевым компонентом аппарата клеточного шаперона. Они представляют собой наиболее консервативный и распространенный класс молекулярных шаперонов, присутствующих в пластидах, митохондриях и цитоплазме всех эукариот и эубактерий. Шаперонины составляют часть сложной кооперативной сети шаперонов, которые обеспечивают правильную укладку вновь синтезированных или денатурированных под стрессом белков [8,15,16].

Первичная последовательность нескольких полипептидов в ячейке состоит из множества доменов с  $\alpha/\beta$  складкой. Такие белки со сложной топологией требуют помощи этих специализированных фальцовочных машин. Шаперонины образуют олигомерные высокомолекулярные комплексы ~800 кДа. Они образуют большую клетку, подобную структуре, образованную двумя гептамерными кольцами, каждое из которых закрывает центральную полость. Гептамер состоит из похожих субъединиц, каждая из которых имеет молекулярный вес 57 кДа [17].

Шаперонины подразделяются на две группы, сходные по структуре и весьма различающиеся по последовательности. Обе группы разделяются по двум разным эволюционным линиям. Шаперонины группы I обнаруживаются в прокариотах и эндосимбиотических органеллах, таких как митохондрии и хлоропласты. Шаперонины группы II существуют в архее и эукариотическом цитозоле [8,18].

4 семейство - HSP 70 – класс молекулярных шаперонов с молекулярным весом от 67 до 76 кДа. Локализованы в цитоплазме, ядре, митохондриях, хлоропластах и эндоплазматической ретикулуле. HSP70 первоначально был обнаружен итальянским генетиком Ферруччо Ритосса в 1960-ые годы, когда температура инкубации дрозофилы была случайно превышена. Изучая хромосомы, Ф.Ритосса обнаружил, что некоторые области хромосом вздулись, что указывало на повышенную транскрипцию гена неизвестного белка. Позже это было описано как «реакция теплового шока», а белки были названы «белками теплового шока» (HSPs). Позже выяснилось, что HSPs экспрессируются не только в ответ на температурный стресс.

Члены семейства HSP70 включают DnaK, HscA (Hsc66) и HscC (Hsc62) у прокариот; эукариотические организмы экспрессируют Hsc70 в цитозоле, HSP70 и его паралоги HSPA1A, HSPA1B и HSPA1L, связывающий белок иммуноглобулина (BiP или Grp78) в эндоплазматическом ретикулуле и mtHSP70 или Grp75 в митохондриях. Все эти белки имеют схожую доменную архитектуру и сходный механизм действия. Помимо основной молекулы HSP70, система шаперонов HSP70 составляет другие важные факторы; ко-шапероны, такие как HSP40 / J-белки и Hip, которые помогают в функции HSP70 и факторах обмена нуклеотидов [19].

Все клеточные функции семейства Hsp70 приписываются способности этих белков связываться с открытыми гидрофобными сегментами в белках-субстратах или частично свернутыми полипептидными цепями, предотвращая непродуктивную ассоциацию гидрофобных областей и тем самым облегчая правильную укладку. Это временное взаимодействие с субстратами регулируется АТФазной активностью другого домена, в то время как АТФазная активность, в свою очередь, стимулируется связыванием субстрата [17].

5 семейство – HSP 90 – класс молекулярных шаперонов с молекулярным весом от 82 до 96 кДа. Семейство HSP90 очень консервативно. Он включает HtpG в бактериальном цитозоле, Grp94 / Grp96 в эндоплазматическом ретикулуле эукариот, HSP75 / TRAP1 в митохондриальном матриксе и HSP90 в эукариотическом цитозоле. Цитозольные Hsp90 далее обозначаются как Hsc82 и HSP82 у дрожжей, HSP83 у *Drosophila*, HSP86 и HSP84 у мышей, HSP90α и HSP90β у человека. Все эти гомологи имеют общий структурный план и, следовательно, имеют сходный способ действия [20].

HSP90 состоит из N-концевого АТФ-связывающего домена, взаимодействующего с субстратом среднего домена и С-концевого домена димеризации [21].

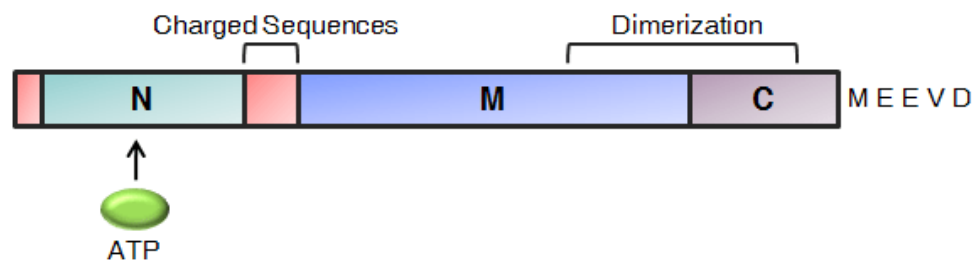


Рисунок 10. Доменная структура HSP90

АТФ-связывающий домен Hsp90 структурно родственен суперсемейству гомодимерных АТФаз, таких как ДНК-гираза и топоизомераза II. Связывание АТФ приводит к димеризации нуклеотид-связывающих доменов и образованию кольцевых структур [20,22]. Это взаимодействие между N-концевыми доменами важно для гидролиза АТФ. Hsp90 в АТФ-связанном состоянии стабильно связывается с полипептидами субстрата, тогда как высвобождение субстрата достигается за счет гидролиза АТФ, вероятно, за счет раскрытия димера Hsp90 [22,23]. Связанный с АТФ Hsp90 охватывает значительный домен субстрата, оптимально освобождая поверхность связывания субстрата [22].

6 семейство – HSP100 – это класс молекулярных шаперонов, способных растворять практически любой белок, который агрегируется при сильном стрессе. Они не требуются при нормальных условиях роста и возникают из-за сильной жары или других тяжелых стрессов.

Эти белки обычно варьируются в размерах примерно от 68 до 110 К.Да и включают в себя цезинолитические протеазы (Clp), а именно, Clp A, Clp B, Clp C, Clp X, Clp Y. ClpA был первым белком класса HSP100, который был обнаружен как компонент АТФ-зависимой протеазы. Он был назван за его способность стимулировать протеолиз казеина (казеинолитическая протеаза или Clp) [8].

Класс HSP100 шаперонов принадлежит к суперсемейству AAA+ АТФаз. Семейство определяется наличием базового ядра из ~200-250 аминокислот, составляющих  $\alpha$ -спиральный домен и нуклеотидно-связывающий домен типа Уолкера. Они обладают способностью ремоделировать белковый АТФ-зависимый субстрат [15].

Шапероны HSP100 разделены на два класса: белки класса I с двумя модулями AAA+ и шапероны класса II. Hsp104, бактериальные ClpB и их дальние родственники ClpA, ClpC относятся к классу I, а ClpX и HslU - к шаперонам II класса [24].

Представители семейства HSP100 функционируют при дезагрегировании, а не для того, чтобы предотвратить агрегирование и неправильное складывание белков при воздействии высокой температуры.

Известно, что на протяжении нескольких десятилетий HSPs были известны как мощный фактор, играющий роль в поддержании гомеостаза живого организма. Универсальные функции HSPs в соответствии с широким диапазоном молекулярной массы необходимы для осуществления своих физиологических ролей через взаимодействие с различными сигнальными путями. Активизация этих путей положительным образом усиливает сигнальный путь HSP и поддерживает / улучшает жизненную функцию HSP в живом организме.

Таким образом, HSPs играют важную роль в поддержании белков и клеточного гомеостаза при адаптации, которая вызвана влиянием различных стрессов

### **Список использованной литературы**

- 1 Hahn, G. M. and Li, G. C. (1982). Thermotolerance and heat shock proteins in mammalian cells. *Radiat. Res.* 92, 452-457.
- 2 Mailhos, C., Howard, M. K. and Latchman, D. S. (1993). Heat shock protects neuronal cells from programmed cell death by apoptosis. *Neuroscience* 55, 621-627.
- 3 Simon, M. M., Reikerstorfer, A., Schwarz, A., Krone, C., Luger, T. A., Jaattela, M. and Schwarz, T. (1995). Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *J. Clin. Invest.* 95, 926-933.
- 4 Warrick, J. M., Chane, H. Y. E., Gray-Board, G. L., Chai, Y., Paulson, H. L. and Bonini, N. M. (1999). Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone HSP70. *Nat. Genet.* 23, 425-428
- 5 Jaattela, M. and Wissing, D. (1993). Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity, possible mechanism of self-protection. *J. Exp. Med.* 177, 231-236.
- 6 Van Molle, W., Wielockx, B., Mahieu, T., Takada, M., Taniguchi, T., Sekikawa, K. and Libert, C. (2002). HSP70 protects against TNF-induced lethal inflammatory shock. *Immunity* 16, 685-695.
- 7 Helen M. Beere. The stress of dying': the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *Journal of Cell Science* 117, 2641-2651 Published by The Company of Biologists 2004. doi:10.1242/jcs.01284
- 8 Lund, P.A. (2001) *Molecular chaperones in the cell.* Oxford University Press, Oxford.

- 9 Mounier N, Arrigo AP. Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress Chaperones*. 2002;7:167–176.
- 10 Pierre Poulain, Jean-Christophe Gelly, Delphine Flatters (2010) Detection and Architecture of Small Heat Shock Protein Monomers *PLoS ONE*, 5(4), e9990.
- 11 Kampinga, H.H. and Craig, E.A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 579-592.
- 12 Rajan, V.B. and D'Silva, P. (2009) Arabidopsis thaliana J-class heat shock proteins: cellular stress sensors. *Funct Integr Genomics*, 9, 433-446.
- 13 Laufen, T., Mayer, M.P., Beisel, C., Klostermeier, D., Mogk, A., Reinstein, J. and Bukau, B. (1999) Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 5452-5457.
- 14 Walsh, P., Bursac, D., Law, Y.C., Cyr, D. and Lithgow, T. (2004) The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep*, 5, 567-571.
- 15 Bukau, B., Weissman, J. and Horwich, A. (2006) Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*, 125, 443-451.
- 16 Martin, J., Horwich, A.L. and Hartl, F.U. (1992) Prevention of protein denaturation under heat stress by the chaperonin Hsp60. *Science*, 258, 995-998.
- 17 Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295, 1852-1858.
- 18 Horwich, A.L., Fenton, W.A., Chapman, E. and Farr, G.W. (2007) Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 115-145.
- 19 Mayer, M.P., Brehmer, D., Gassler, C.S. and Bukau, B. (2001) Hsp70 chaperone machines. *Adv Protein Chem*, 59, 1-44.
- 20 Young, J.C., Moarefi, I. and Hartl, F.U. (2001) Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol*, 154, 267-273.
- 21 Jackson SE. Hsp90: structure and function. *Top Curr Chem*. 2013;328:155–240.]
- 22 Pearl, L.H. and Prodromou, C. (2006) Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem*, 75, 271-294.
- 23 Buchner J. (1999) Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci.*, 24(4), 136-141.
- 24 Doyle, S.M. and Wickner, S. (2009) Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. *Trends Biochem Sci*, 34, 40-48.