

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ШАПЕРОНИНЫ ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ И ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

©2006 г. В. В. МАРЧЕНКОВ, Н. Ю. МАРЧЕНКО,
С. Ю. МАРЧЕНКОВА, Г. В. СЕМИСОТНОВ

Институт белка РАН, Пущино, Московская область

I. Введение. II. Шаперонины – шапероны с олигомерной (кольцевой) организацией. III. Шаперонин GroEL: взаимодействие с лигандами и модели функционирования. IV. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Экспериментальные исследования процессов денатурации и ренатурации белков *in vitro* привели к важному заключению, что вся необходимая и достаточная информация о пространственной структуре белка заключена в его аминокислотной последовательности (см. обзор [1]). Однако исследования процессов жизнедеятельности клетки и сворачивания белков *in vivo* выявили ряд клеточных компонентов, которые вовлечены либо в катализ процесса сворачивания белков, либо в регуляцию распределения вновь синтезированных белков между конкурирующими путями сворачивания и агрегации [1–3].

К концу 80-х годов сложилось представление, согласно которому определенные белковые факторы могут играть весьма важную роль в процессах формирования и поддержания нативной конформации белка в клетке. На основе имевшихся данных Эллисом [4] была сформулирована идея ассистируемой самоорганизации белков в противоположность спонтанной. Эта концепция предполагает, что хотя сворачивание белков является спонтанным процессом, существуют критические стадии, на которых участие специальных клеточных факторов может оказаться необходимым. Роль таких факторов, названных молекулярными шаперонами, состоит в обеспечении опти-

Адрес для корреспонденции: Г. В. Семисотнов, nina@vega.protres.ru

Работа поддержана грантом РФФИ и правительства Московской области № 04-04-97293Р 2004 наукоград, грантом Программы Президиума РАН по молекулярной и клеточной биологии и грантом ННМИ № 55005607

мальных условий для протекания процесса сворачивания белков путем устранения «помех» или «неадекватных контактов».

Шапероны входят в состав большого семейства белков теплового шока (heat shock proteins (hsp)), синтез которых в клетке значительно увеличивается в ответ на тепловой шок или другие виды клеточных стрессов [5]. Вместе с тем и при нормальных условиях большинство белков этого семейства синтезируется довольно интенсивно. Широкий диапазон функций шаперонов включает стабилизацию промежуточных конформаций различных белков в процессе созревания *in vivo*, ассистирование сборки олигомерных комплексов, участие в трансмембранном транспорте белков и деградации короткоживущих белков цитозоля [2], а также предотвращение летальной неспецифической ассоциации белков в стрессовых для клетки условиях [5].

К настоящему времени шапероны обнаружены как в прокариотических, так и в эукариотических организмах и их разделяют на несколько классов по молекулярной массе мономерных форм, которая варьирует от 10 кДа до 110 кДа [6]. Некоторые шапероны являются гомо- или гетероолигомерами, состоящими из большого количества субъединиц, объединенных обычно в «кольцевые» структуры. Такие сложные четвертичные структуры характерны, например, для шаперонов класса hsp60 [7, 8] и для некоторых представителей класса малых белков теплового шока (small heat-shock proteins) [9, 10]. Структурным и функциональным свойствам шаперонов различных классов посвящено большое количество подробных обзоров (см., например, [11–14]).

Цель настоящего обзора состоит в анализе структурных и функциональных свойств белков одного из наиболее изученных классов молекулярных шаперонов – класса hsp60, часто называемых молекулярными шаперонинами [15]. Общим структурным свойством шаперонина является то, что их четвертичная структура образована двумя взаимодействующими друг с другом «кольцами», состоящими из 7–8 субъединиц (с молекулярной массой ~ 60 кДа каждая).

II. ШАПЕРОНИНЫ – ШАПЕРОНЫ С ОЛИГОМЕРНОЙ (КОЛЬЦЕВОЙ) ОРГАНИЗАЦИЕЙ

Первый крупный олигомерный шаперон (GroEL) был обнаружен в клетках *Escherichia coli* в начале 70-х годов как белок, необходимый для сборки фага лямбда [16, 17]. Было показано, что он способен нековалентно связываться с мономерной формой белка В фага лямбда,

обеспечивая сборку головки фага. GroEL принадлежит к числу доминирующих белков клеток *E. coli* и в нормальных условиях. Однако в условиях стресса доля этого белка в клетке резко возрастает [18].

В клетке GroEL может взаимодействовать как с вновь синтезируемыми белками, так и с белками, которые по каким-либо причинам утратили свою жесткую структуру [15, 19–22], а нарушения экспрессии гена GroEL приводят к гибели клеток [23]. GroEL не обладает специфичностью по отношению к белковым мишеням. Исследования *in vitro* показали, что около 50% белков из экстракта клеток *E. coli*, будучи денатурированными, взаимодействуют с GroEL [24]. Также показано, что более 30% различных белков не способны свернуться в нативное состояние при отсутствии в клетке GroEL [21]. В экспериментах по ренатурации белков *in vitro* показано, что GroEL увеличивает выход нативного белка, ингибируя агрегацию несвернутых белков [25]. В ряде случаев для осуществления своей функции GroEL необходимо взаимодействовать с другим олигомерным белком теплового шока, названным GroES (hsp10) [26, 27].

По данным электронной микроскопии [7] и рентгеноструктурного анализа [8, 28], GroEL состоит из 14 идентичных субъединиц по 57 кДа каждая. Субъединицы образуют два гептамерных кольца, лежащих друг на друге. Закристаллизованная структура GroEL представляет собой цилиндр высотой 145 Å и 135 Å в диаметре, с центральным каналом, диаметр которого составляет около 45 Å [8, 28] (рис. 1).

В каждой субъединице GroEL (547 аминокислотных остатков) четко выражены три домена: апикальный, средний (промежуточный) и экваториальный (рис. 1). Апикальные домены (остатки 191–376) формируют торцы GroEL цилиндра и вовлечены в связывание белковых субстратов и ко-шаперонина, белка GroES. Каждый такой домен имеет подвижный сегмент (не разрешенный в первой из работ по рентгеноструктурному анализу GroEL [8]), который содержит большое количество гидрофобных остатков, обращенных во внутреннюю полость цилиндра. Замены этих высококонсервативных гидрофобных остатков (двух – тирозина, одного – фенилаланина, трех – лейцина и двух – валина) на гидрофильные приводят к потере способности GroEL связывать ненативные белки и GroES [30]. По данным электронной микроскопии, ненативный белок связывается в начале центрального канала [31–34]. На основании всего этого предполагается, что основную роль в связывании GroEL с ненативными белками играют именно эти гидрофобные остатки.

Экваториальный домен (остатки 6–133 и 409–523, всего 243) – самый большой домен субъединицы GroEL. Этот домен образован

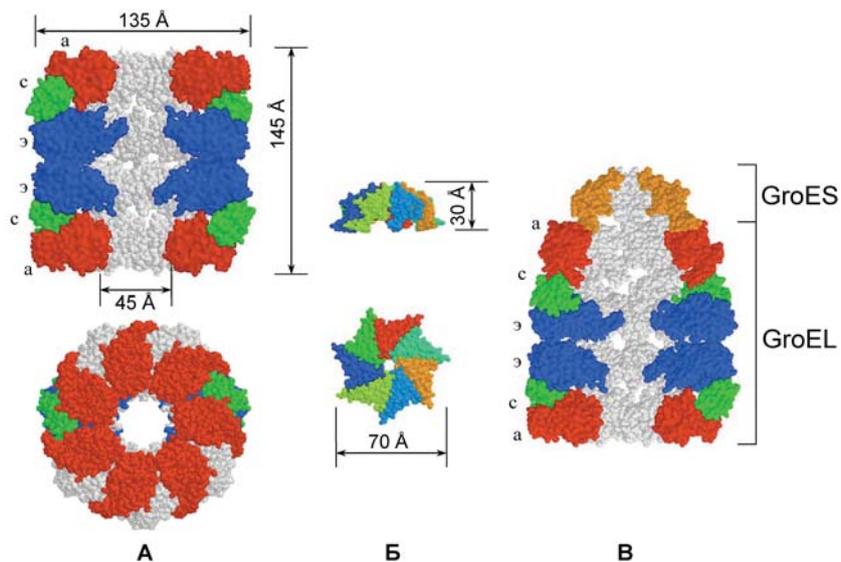


Рис. 1. Пространственные структуры шаперонина GroEL и ко-шаперонина GroES клеток *E. coli*:

А – 14-субъединичный двухкольцевой шаперонин GroEL, вид сбоку (вверху) и с торца (внизу). Для отображения строения внутренней полости шаперонина на виде сбоку удалены по 3 субъединицы каждого кольца.

Б – 7-субъединичный однокольцевой ко-шаперонин GroES, вид сбоку (вверху) и сверху (внизу).

В – комплекс шаперонина GroEL с ко-шаперонином GroES. Для отображения строения внутренней полости комплекса удалены по 3 субъединицы из каждого кольца GroEL и GroES.

Различным цветом выделены домены субъединиц GroEL (а – апикальный (концевой), с – средний (промежуточный), э – экваториальный домены) и субъединицы GroES. Рисунок подготовлен с помощью программы RasWin (Based on RasMol 2.6 by Roger Sayle, Biomolecular Structures Group, Glaxo Wellcome Research & Development, Stevenage, Hertfordshire, UK) из файлов 1DER [29] и 1AON [27], находящихся в банке белковых структур PDB.

в основном α -спиральными участками и обеспечивает основные контакты между субъединицами в кольце и контакты между кольцами GroEL-частицы. Координаты 22 C- (25 – в первой работе по рентгеноструктурному анализу GroEL [8]) и 1 N-концевого (5 – в первой работе [8]) аминокислотных остатков GroEL не решены рентгеноструктурным анализом, по-видимому, из-за их

высокой подвижности [28]. Однако с помощью метода электронной микроскопии и диффузного рассеяния нейтронов показано, что эти неструктурированные концевые остатки находятся в центральном канале GroEL на уровне экваториальных доменов [31, 33, 35].

Средний (промежуточный) домен субъединицы GroEL самый маленький (остатки 134–190 и 377–408, всего 89). Он образует подобие шарнирного соединения между верхним и экваториальным доменами [8]. Анализ лиганд-индуцируемых конформационных изменений GroEL методом электронной микроскопии [7] и сравнение кристаллических структур GroEL и комплекса GroEL–GroES [8, 27] (рис. 1) подтверждают, что основные лиганд-индуцируемые изменения структуры GroEL происходят благодаря подвижности среднего домена. Мутации в среднем домене могут частично или полностью подавить функции GroEL [30].

Ко-шаперонин GroES состоит из 7 идентичных субъединиц (с молекулярной массой 10 кДа каждая) и представляет собой купол с высотой приблизительно 30 Å и диаметром 70–80 Å, с отверстием около 10 Å. Внутренняя полость имеет высоту 20 Å и диаметр 30 Å. Структура GroES имеет такую же симметрию, что и GroEL [36] (рис. 1).

Система, подобная шаперонной системе GroEL/ES клеток *E. coli*, также состоящая из двух компонентов hsp60 и hsp10, была обнаружена в митохондриях и хлоропластах эукариотических клеток [15, 37]. Эти белки обладали очень высокой гомологией с аналогичными белками клеток *E. coli* (GroEL и GroES) [15], что дало основание предполагать наличие сходства их пространственных структур. Существует и другая группа шаперонинов, которая обладает меньшей, но, тем не менее, значительной гомологией с первой группой шаперонинов [38, 39]. Эта группа включает шаперонины архей: термосому [40, 41] и термофильный фактор 55 (TF55) [42], а также ССТ, который был обнаружен в цитозоле эукариот [43, 44]. В отличие от GroEL и митохондриального hsp60, архейные шаперонины TF55 [42] и термосома [45] состоят из двух типов субъединиц, а эукариотический шаперонин ССТ состоит из 7–9 различных типов субъединиц, в зависимости от организма [39, 43, 46]. Самым удивительным различием между ССТ и другими шаперонинами является очень большая гетерогенность его составных частей [39, 43, 46], каждая из которых независимо кодируется высокодивергентными генами [39]. Было показано, что ССТ обеспечивает сворачивание актина [47, 48] и тубулина [48, 49] (это его основные белковые субстраты), а также взаимодействует и с другими белками (9–15% вновь синтезированных белков, с молекулярной массой преимущественно от 30 до 60 кДа [50]; см. подроб-

ный обзор [51]). Этот шаперонин, возможно, играет некоторую роль в организации цитоскелета нервных клеток [52].

Четвертичная структура hsp60 из различных организмов (по данным электронной микроскопии) одинакова и, как и в случае GroEL, представляет собой цилиндр, состоящий из двух колец по 7 идентичных субъединиц в каждом, с внутренней полостью и

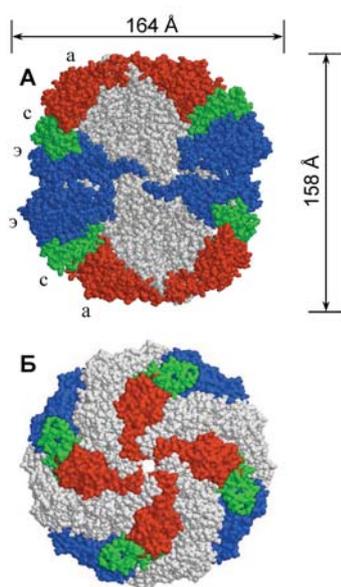


Рис. 2. Пространственная структура 16-субъединичного двухкольцевого комплекса термосомы – шаперонина из *Thermococcus* sp.

А – вид сбоку; для отображения строения внутренней полости шаперонина удалены по 4 субъединицы каждого из двух колец; различным цветом выделены домены субъединиц (а – апикальный, с – средний, э – экваториальный домены) и внутренняя полость шаперонина.

Б – вид сверху; различным цветом выделены домены 4-х из 8 верхних субъединиц. Рисунок подготовлен аналогично рис. 1 из файла 1Q3R [60], находящегося в банке белковых структур PDB.

симметрией 7-го порядка [53–56]. Однако hsp60 митохондрий клеток животных может иметь (по данным электронной микроскопии) и однокольцевую семисубъединичную структуру [57]. Шаперонины TF55 и CCT обладают симметриями 8-го порядка и также состоят из двух взаимодействующих кольцевых структур с внутренней полостью [41, 43, 45].

Данные электронной микроскопии были затем подтверждены кристаллографическими исследованиями различных шаперонинов [8, 58, 59]. Так, кристаллическая структура термосомы была определена с разрешением 2.6 Å [58] (рис. 2). Два взаимодействующих друг с другом кольца этого шаперонина состоят из восьми субъединиц двух типов (α и β) каждое $[(\alpha, \beta)_4 (\alpha, \beta)_4]$. Структуры этих субъединиц оказались похожи друг на друга и на структуру субъединицы GroEL (см. рис. 1 и 2). Каждая субъединица термосомы (рис. 2) состоит из экваториального, среднего (промежуточного) и апикального (верхнего) доменов. Внутрикольцевые контакты между экваториальными доменами похожи на аналогичные контакты в GroEL-частице. Вместе с тем, межкольцевые контакты различаются, поскольку

α -субъединицы одного кольца взаимодействуют с α -субъединицами другого кольца, а β -субъединицы – с β -субъединицами. Кроме того, на апикальном домене в местах, где у GroEL располагаются обращенные во внутреннюю полость гидрофобные остатки (предположительно связывающие ненативные белки), у термосомы расположены, в основном, гидрофильные остатки.

Вышеизложенное можно резюмировать следующим образом. Шаперонины представляют собой олигомерные белки с высокой степенью гомологии, организованные схожим образом. Все они состоят из двух взаимодействующих друг с другом кольцевых структур по 7–8 субъединиц в каждой, образующих внутреннюю полость. Каждая субъединица состоит из трех доменов, обеспечивающих высокую конформационную изменчивость шаперонинов при их взаимодействии с субстратами и лигандами. Можно также предположить, что структурное сходство шаперонинов из различных клеток (как прокариотических, так и эукариотических) подразумевает сходство механизмов их функционирования как шаперонов.

III. ШАПЕРОНИН GROEL: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ЛИГАНДАМИ И МОДЕЛИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ

GroEL является наиболее полно охарактеризованным (как со структурной, так и с функциональной точки зрения) представителем класса шаперонинов и поэтому часто приводится в качестве примера участия шаперонинов в процессе сворачивания белков *in vivo* и *in vitro*. Процесс GroEL-ассистируемого сворачивания белков можно разделить на два этапа: 1) связывание полипептидной цепи, лишенной жесткой третичной структуры, с GroEL-частицей и 2) лиганд-зависимое сворачивание белковой мишени в нативную структуру.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ GROEL С НЕНАТИВНЫМИ БЕЛКАМИ

Белковым субстратом молекулярного шаперона GroEL является в той или иной степени развернутая, ненативная полипептидная цепь. Шаперонины способны связывать как небольшие (~2 кДа) неструктурированные полипептиды [61, 62], так и крупные (до 100 кДа) белки, находящиеся в денатурированном состоянии [63–66]. Белки могут находиться в ненативном состоянии как в процессе или сразу после завершения их синтеза на рибосоме, так и вследствие воздействия повышенной температуры или других денатурирующих факторов на зрелые белки. GroEL хорошо взаимодействует с различными полипептидами как прокариотических, так и эукариотических организмов

[19, 67–70]. Комплекс стабилизируется в основном гидрофобными взаимодействиями [30, 71]. Дополнительный вклад вносят также электростатические взаимодействия (сродство GroEL к своим белковым субстратам меняется в зависимости от ионных условий среды) [72–74].

Для выяснения роли гидрофобных взаимодействий в функционировании GroEL было проведено большое количество исследований. Так, Ричардс с соавторами исследовали взаимодействие GroEL с различными аминокислотами и показали, что GroEL прочнее всего взаимодействует с гидрофобными аминокислотами (Ile, Phe, Val, Leu, Trp). Однако GroEL взаимодействует и с менее гидрофобными, и даже с заряженными аминокислотами (Ala, Tyr, Thr, Glu, Gln, His, Lys, Arg, Pro) [75]. Лэндри и Гириш синтезировали полипептид из 13 аминокислотных остатков, включавший в себя N-концевую часть роданазы (Ac-STKWLAESVRAGK-NH₂), который как показано методом ЯМР, связывается с GroEL. Интересно, что этот пептид является неструктурированным в растворе, но образует α -спираль при связывании с GroEL [76]. Другой, более гидрофобный пептид vsv-C (KLIGVLSSLFRPK) также формирует α -спираль при связывании с GroEL, хотя в растворе этот пептид лишь частично спирален [77]. Более удобными для исследования GroEL-пептидных комплексов оказались так называемые «минишапероны» (представляющие собой часть апикального (т.е. пептид-связывающего) домена GroEL – аминокислотные остатки с 191 по 345). Было показано, что такие минишапероны функционально активны [78]. Результаты, полученные с использованием минишаперонов, указывают на то, что GroEL может связывать полипептиды, имеющие как вытянутую (β -участки), так и α -спиральную конформации, содержащие не только гидрофобные, но и полярные (в том числе положительно заряженные) аминокислотные остатки [79]. Чтобы оценить вклад гидрофобных взаимодействий в стабилизацию комплекса GroEL с белковой мишенью, проводились также исследования с помощью изотермической калориметрии [68]. Показано, что неспособный к ренатурации мутант субтилизина (BPN' PJ9) связывается с GroEL с положительным изменением энтальпии (+19.9 ккал/моль) и отрицательным изменением теплоемкости ($\Delta C_p = -0.85$ ккал \times моль⁻¹ \times град⁻¹). При связывании α -казеина происходит похожий скачок теплоемкости, что позволяет предположить, что в процессе связывания основную роль играют гидрофобные взаимодействия. Из скачка теплоемкости авторы [68] рассчитали, что поверхность субтилизина (BPN' PJ9), взаимодействующая с GroEL, составляет около 3 Å². Интересно, что гидрофобная поверхность апикального домена GroEL составляет

около 4.5 \AA^2 [28]. Показано также, что внутренняя полость GroEL изменяет степень своей гидрофобности в результате связывания различных лигандов шаперона. Предполагается, что это необходимо для сокращения времени пребывания полипептида в связанном с шапероном состоянии [80].

Из всего вышесказанного можно заключить, что GroEL не обладает специфичностью к определенным аминокислотным остаткам или структурным элементам своих полипептидных мишеней. Степень экспонированности гидрофобных аминокислотных остатков в белке-мишени может определять относительную стабильность комплекса GroEL-белок. Полипептидные цепи, способные связываться с GroEL, как правило, содержат коллапсированные, но слабо упакованные элементы вторичной структуры. Белки в таких конформациях, в большинстве случаев, имеют существенно большую степень экспонированности гидрофобных аминокислотных остатков, чем в нативном состоянии.

В последнее время все больше внимания уделяется электростатическим взаимодействиям, которые, как и гидрофобные, играют важную роль в белок-белковых взаимодействиях [81]. Апикальный домен каждой субъединицы GroEL (который, собственно, и взаимодействует с ненативной белковой мишенью) заряжен отрицательно (pI 4.7) при нейтральных значениях pH. Можно предположить, что электростатические взаимодействия особенно важны для взаимодействия GroEL с положительно заряженными субстратами. Так, искусственно синтезированная полилизинная цепь (заряженная положительно при нейтральных значениях pH) связывается с GroEL, образуя устойчивый комплекс. Ненативная малатдегидрогеназа (природный субстрат GroEL) уже не способна связываться с таким комплексом. Из этого можно заключить, что данные мишени конкурируют за одни и те же сайты связывания на апикальном домене GroEL [82]. Предложена модель, согласно которой на первом этапе связывания белкового субстрата с GroEL важны именно электростатические взаимодействия. Затем, в результате конформационных изменений шаперона, происходит увеличение степени экспонированности его гидрофобных кластеров, и стабилизация комплекса осуществляется уже за счет гидрофобных взаимодействий [67]. Сродство GroEL к белковым субстратам меняется в зависимости от ионных условий среды. Например, при низких значениях ионной силы положительно заряженная при нейтральных pH барназа (pI 8.8) в процессе своего сворачивания *in vitro* взаимодействует с GroEL, в то время как при высокой ионной

силе (больше 600 мМ) барназа сворачивается самостоятельно в растворе [67]. Вместе с тем скорость сворачивания барназы в отсутствие GroEL не зависит от ионной силы. То есть наличие ионов в растворе является важным на стадии связывания GroEL и мишени. Для положительно заряженного при нейтральных pH апоцитохрома С (pI 10.1) было также показано, что его сродство к GroEL уменьшается при увеличении концентрации солей в растворе. С другой стороны, прочность связывания GroEL с отрицательно заряженным ненативным α -лактальбумином увеличивается при добавлении соли в раствор [83].

Таким образом, степень сродства GroEL к ненативным белкам определяется балансом гидрофобных и электростатических взаимодействий, который может регулироваться как лигандами GroEL, так и внешними условиями (температурой, ионной силой и pH раствора и так далее).

ЛИГАНДЫ GROEL

Функционирование GroEL как шаперона обеспечивается его взаимодействием с рядом лигандов: ионами K^+ и Mg^{2+} , адениловыми нуклеотидами (АДФ и АТФ) и менее крупным, по сравнению с GroEL, ко-шаперонином GroES [26, 84]. Свободный GroEL обладает слабой АТФазной активностью (скорость гидролиза составляет 0.1 сек^{-1} на одну субъединицу) при наличии ионов K^+ в растворе [73]. Прочное кооперативное связывание Mg-АТФ ($K_{\text{дисс}} = 10 \text{ мкМ}$) приводит к конформационным изменениям GroEL-частицы [11, 85]. Связывание и гидролиз АТФ одновременно происходит на субъединицах только одного гептамерного кольца GroEL, обуславливая асимметрию олигомерной частицы. В результате гидролиза АТФ образуется комплекс GroEL/АДФ₇, в котором АДФ прочно связан с GroEL ($K_{\text{дисс}} = 2\text{--}7 \text{ мкМ}$). Наличие связанного АДФ на одном кольце приводит к понижению эффективности его связывания противоположным кольцом ($K_{\text{дисс}} = 2.3 \text{ мМ}$) при формировании комплекса GroEL/АДФ₁₄ [86].

Низкомолекулярные лиганды (адениловые нуклеотиды), взаимодействуя с GroEL в присутствии ионов Mg^{2+} , способны понижать константу связывания с ним белковых мишеней. Эффективность этого влияния снижается в ряду АТФ > АМР-РНР (аденилилимидофосфат – негидролизуемый аналог АТФ) > АДФ [87]. Конформационные изменения, происходящие при связывании адениловых нуклеотидов с GroEL, были исследованы с помощью метода электронной микроскопии [7]. Структуры GroEL в комплексе с АДФ, АМР-РНР и АТФ различаются между собой, однако у них есть и общие свойства – большая вытянутость по сравнению с GroEL без лигандов, а также поворот

апикальных доменов по часовой стрелке (если смотреть с торца GroEL-частицы). Следует отметить, что подобный поворот приводит к перемещению гидрофобных сайтов связывания полипептидов из внутренней полости на межсубъединичную поверхность, причем степень доступности гидрофобных остатков уменьшается в ряду GroEL > GroEL-АДФ > GroEL-АТФ [7]. Скорее всего, именно это структурное изменение и приводит к понижению сродства GroEL к связанным полипептидам в присутствии адениловых нуклеотидов.

В присутствии Mg-АТФ GroEL и GroES быстро образуют комплекс GroEL₁₄/АТФ₇/GroES₇ (константа скорости более 4×10^7 М⁻¹сек⁻¹). Последующий гидролиз АТФ приводит к образованию очень стабильного комплекса GroEL₁₄/АДФ₇/GroES₇ с константой диссоциации ~0.3 нМ [86, 88]. GroEL-частица имеет высокое сродство к одному семисубъединичному олигомеру GroES и низкое – ко второму олигомеру GroES, так что сначала было показано наличие асимметричного комплекса одной GroEL-частицы с одним олигомером GroES [88, 89] (см. рис. 1). Однако GroEL-частица может образовывать комплекс и с двумя олигомерами GroES, причем доля симметричного комплекса прямо зависит от соотношения АТФ/АДФ и от концентрации ионов K⁺ в растворе [90]. Электронная микроскопия GroEL–GroES-комплекса в присутствии АДФ, AMP-PNP и АТФ показывает больший диапазон конформационных изменений GroEL в комплексе с GroES по сравнению с изолированным GroEL. Апикальные домены *cis*-кольца GroEL радикально меняют свою форму и поворачиваются в сторону GroES [7]. Аналогичная картина наблюдается и в кристалле GroEL₁₄/АДФ₇/GroES₇ [27]. Содержание АТФ и АДФ в клетке составляет 2–10 мМ и 0.5–1 мМ соответственно, а GroES (по оценкам различных авторов) присутствует в эквимольных концентрациях к GroEL. При таких условиях GroES в присутствии АТФ склонен к быстрому связыванию с GroEL с образованием асимметричного комплекса GroEL–GroES. Таким образом, можно предположить, что в клетке в обычном состоянии одно из колец каждой молекулы GroEL связано с GroES.

В таблице представлены данные по ренатурации в присутствии GroEL различных белков из развернутого денатурантами состояния. Ранние кинетические промежуточные состояния всех этих белков связываются с GroEL, что приводит к замедлению кинетики их сворачивания [73]. Лиганды GroEL приводят к диссоциации этих комплексов и к ускорению приобретения белками нативной структуры [73]. Приобретение сворачивающимися в присутствии GroEL белками нативной структуры обеспечивается различным набором лигандов

Таблица.
**Условия высвобождения различных белковых мишеней
из комплекса с GroEL в процессе их ренатурации
в присутствии шаперонина**
[адаптировано из http://bioc09.uthscsa.edu/~seale/Chap/el_int.html]

Белок	Условия высвобождения белка из комплекса с GroEL
1	2
Алкогольоксидаза	Mg-АТФ
α -Глюкозидаза	Mg-АТФ
Аспаратаминотрансфераза	Mg-АТФ + GroES или Mg-АТФ
Барназа	Mg-АТФ или нет
Предшественник β -лактамазы	Mg-АТФ + GroES
Предшественник малой субъединицы рибулозо-1,5-бисфосфат-карбоксилазы	GroES + Mg-АТФ; казеин + Mg-АТФ
Цитратсинтаза	GroES + Mg-АТФ
Циклофилин	GroES + Mg-АДФ
Дигидрофолатредуктаза	Mg-АТФ необходим; GroES помогает
Додекамерная глутаминсинтаза	Mg-АТФ; или Mg-АДФ + GroES
Дегидрогеназа α -кетокислот	GroES + Mg-АТФ
Фрагмент F _{ab} моноклонального антитела	GroES + Mg-АТФ
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	нет или Mg-АТФ
РНКаза гранулоцитов	Mg-АТФ
Лактатдегидрогеназа	Mg-АТФ или Mg-АМФ-PNP
Малатдегидрогеназа	Mg-АТФ; K ⁺ не обязателен
Негликозилированная инвертаза	Mg-АТФ; GroES помогает; гликозилированная форма не взаимодействует с GroEL
Орнитинтранскарбамилаза	GroES + Mg-АТФ; аналоги АТФ с GroES не оказывают влияния на сродство орнитин транскарбамилазы к GroEL
Фитохромный фоторецептор	Mg-АТФ
Рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза (Rubisco)	GroES + Mg-АТФ
Триптофаназа	АТФ, АДФ, АМФ-PNP
Тубулины	GroES + Mg-АТФ

См. окнчание табл. на стр. 291

окончание табл.

1	2
Энолаза дрожжей	Mg-АТФ; или Mg-АДФ + GroES
Така-амилаза А	GroES + АТФ или АДФ
β -Галактозидаза <i>E. coli</i>	GroEL препятствует агрегации, GroEL + АТФ или АМФ-PNP способствуют агрегации
Роданаза	GroES + Mg-АТФ и K ⁺
Глицеролдегидрогеназа	АТФ ускоряет кинетику сворачивания; GroES не требуется
Трихосантин	Mg-АТФ
Стафилококковая нуклеаза	АТФ ускоряет сворачивание; АТФ + GroES обеспечивают максимальный выход свернутого белка

шаперонина: как Mg-АТФ (или его нерасщепляемым аналогом АМФ-PNP) и Mg-АДФ по отдельности, так и вместе с ко-шаперонином GroES (см. также [25, 73, 91–95]). Из этих данных можно заключить, что в присутствии GroEL приобретение сворачивающимися белками нативной структуры не требует обязательного наличия определенного набора лигандов или процесса гидролиза АТФ.

МОДЕЛИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ GROEL КАК МОЛЕКУЛЯРНОГО ШАПЕРОНА

Данные электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа, указывающие на наличие полости в каждом из колец GroEL-частицы и на значительное увеличение размера этой полости при взаимодействии с ко-шаперонином GroES (см. рис. 1), наводят на мысль, что эта внутренняя полость может быть тем местом, где происходит приобретение нативной структуры белковой мишенью, связанной с GroEL. Действительно, в начале 90-х годов была предложена модель шаперонин-ассистируемого сворачивания белков в так называемой «ячейке Anfinsen» («Anfinsen cage»), образованной полостью одного из колец GroEL и «куполом» GroES (см. рис. 1), что устраняет нежелательные контакты сворачивающихся белковых молекул друг с другом и с иными молекулами [96]. Эта модель впоследствии не раз дополнялась [71, 97, 98] и в настоящее время является наиболее популярной [99–101]. В общем виде, согласно этой модели, функционирование GroEL как молекулярного шаперона можно представить как цикл, состоящий из следующих этапов (рис. 3):

1) ненативный белок связывается во внутренней полости GroEL

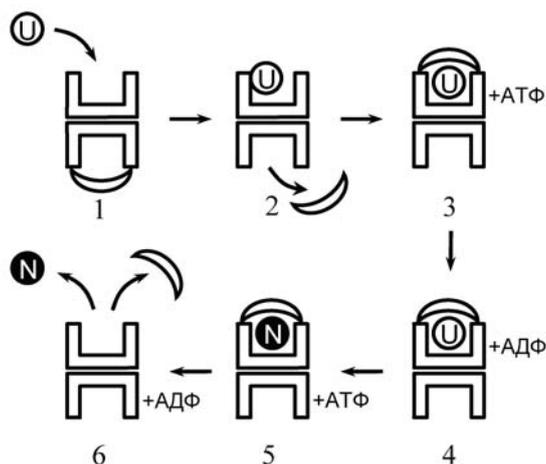


Рис. 3. Схема, иллюстрирующая модель GroEL/ES ассистируемого сворачивания белка во внутренней полости шаперонина («ячейке Анфинсена»). Пояснения в тексте.

с противоположной стороны от ассоциированного GroES;

2) связывание белковой мишени приводит к диссоциации GroES;

3) GroES совместно с АТФ повторно связываются с GroEL (на этот раз с кольцом, ассоциированным с белком);

4) кооперативный гидролиз семи молекул АТФ одним кольцом GroEL приводит к повышению его сродства к GroES, и белковая мишень, находящаяся в *cis*-положении к GroES, становится способной к дальнейшему сворачиванию;

5) это приводит к увеличению сродства *trans*-кольца GroEL к АТФ;

6) гидролиз АТФ на *trans*-кольце GroEL приводит к диссоциации GroES и освобождению свернутого белка, а последующая посадка белковой мишени ведет к началу нового цикла.

Таким образом, GroEL функционирует как молекулярная «машина», управляемая своими лигандами, взаимодействие с которыми приводит к аллостерическим конформационным изменениям структуры шаперона и определяет различные стадии цикла. Сворачивание белка происходит спонтанно во внутренней полости GroEL под крышкой GroES («ячейка Анфинсена»). Если белок не сворачивается, цикл повторяется.

Экспериментальной проверке этой модели посвящено большое количество работ (см., например, [98–102]), и надо отметить, что большинство данных укладывается в рамки этой модели. Однако существует ряд экспериментальных фактов, указывающих на то, что

модель сворачивания белка во внутренней полости шаперонина, по крайней мере, не является универсальной. Во-первых, GroEL/ES assisteрует сворачивание очень крупных (~100 кДа) белков, которые не могут поместиться во внутреннюю полость шаперонина даже будучи в компактной конформации [63, 64]. Более того, GroEL способен assisteровать сворачивание ряда белков *in vitro* не только в отсутствие GroES, но и в отсутствие гидролиза АТФ (см. табл.). Во-вторых, сравнительно недавно было показано, что эукариотический цитозольный шаперонин ССТ способен assisteровать сворачивание белков даже в том случае, когда его внутренняя полость частично занята антителом [103]. В-третьих, денатурированный белок, который может поместиться во внутреннюю полость GroEL, но не может приобрести нативную конформацию в условиях функционирования GroEL как молекулярного шаперона, не удерживается во внутренней полости комплекса GroEL с GroES [104, 105], как это следует из модели сворачивания белка в «ячейке Анфинсена» (см. рис. 3). Действительно, если белковая молекула остается все время денатурированной, то она, согласно модели, должна постоянно находиться в полости GroEL под «крышкой» GroES. Тем не менее, в присутствии GroES и АДФ (то есть в условиях формирования комплекса GroEL с GroES) ненативный белок диссоциирует с поверхности GroEL и может даже агрегировать с такой же эффективностью, как и в отсутствие шаперонина (рис. 4).

В кинетических экспериментах по исследованию сворачивания (ренатурации) различных белков в присутствии GroEL и его лигандов показано, что ранние кинетические промежуточные состояния типа «расплавленная глобула» быстро связываются с GroEL в отсутствие его лигандов [65, 72, 108]. Однако связывание ранних кинетических промежуточных состояний сворачивающихся белков с GroEL не приводит к полному ингибированию сворачивания белка, а только замедляет формирование его нативной структуры (рис. 5). Причем, замедление тем сильнее, чем больше молярный избыток GroEL над сворачивающимся белком [108] (рис. 5). Такое поведение сворачивающегося белка в присутствии GroEL можно объяснить, только предположив, что ранние кинетические промежуточные состояния сворачивающихся белков, связывающиеся с GroEL, не могут приобрести свою нативную структуру в комплексе с шаперонином, но могут диссоциировать с его поверхности и сворачиваться спонтанно в свободном состоянии (то есть в растворе) [108]. Замедление процесса сворачивания белка в присутствии молярного избытка GroEL тем сильнее, чем сильнее взаимодействие промежуточного

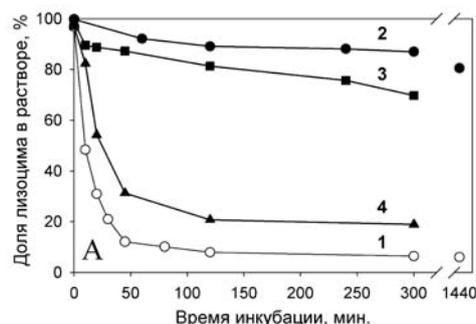
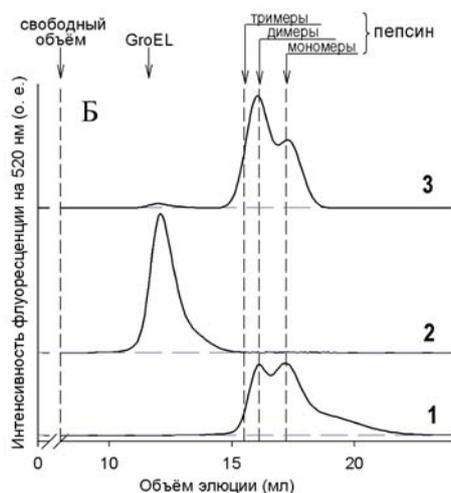


Рис. 4. Влияние ко-шаперонина GroES на диссоциацию комплекса GroEL с ненативными белками:

А – кинетика агрегации меченого флуоресцеинизотиоцианатом лизоцима в присутствии 50 мМ дитиотрейтола, восстанавливающего внутримолекулярные дисульфидные связи, стабилизирующие нативную структуру белка [106], в отсутствие GroEL (1), в присутствии двукратного молярного избытка GroEL (2), в присутствии двукратного молярного избытка GroEL и 2 мМ Mg-АДФ (3) и в присутствии двукратного молярного избытка GroEL после добавления двукратного молярного избытка GroES и 2 мМ Mg-АДФ (4).



Б – профили элюции флуоресценции меченого денатурированного (при pH 7.5) пепсина [107] в отсутствие (1) и в присутствии эквимольного количества GroEL без лигандов (2) и в присутствии 0.1 мМ АДФ и эквимольного количества GroES (3).

Ковалентное присоединение флуоресцеиновой метки к лизоциму и пепсину не изменяет свойств их денатурированных состояний и их сродства к GroEL.

Рисунки адаптированы из работ авторов [104, 105].

состояния с шапероном (а оно, в свою очередь, определяется балансом электростатических и гидрофобных взаимодействий, стабилизирующих комплекс). Добавление лигандов GroEL (Mg-АДФ, Mg-АТФ и GroES) приводит к ослаблению взаимодействия шаперона с ранними кинетическими промежуточными состояниями сворачивающегося белка и, следовательно, к увеличению времени пребывания белковых молекул в свободном состоянии и увеличению вероятности приобретения ими нативной структуры (т.е. к уменьшению замедления их сворачивания в присутствии GroEL) [108, 109] (см. также табл.).

Белок митохондрий аконитаза слишком велик (82 кДа), чтобы поместиться во внутреннюю полость комплекса GroEL-GroES, однако этот комплекс предотвращает агрегацию аконитазы как *in vivo*, так и *in vitro* [64]. В этом случае GroES и АТФ функционируют, не будучи

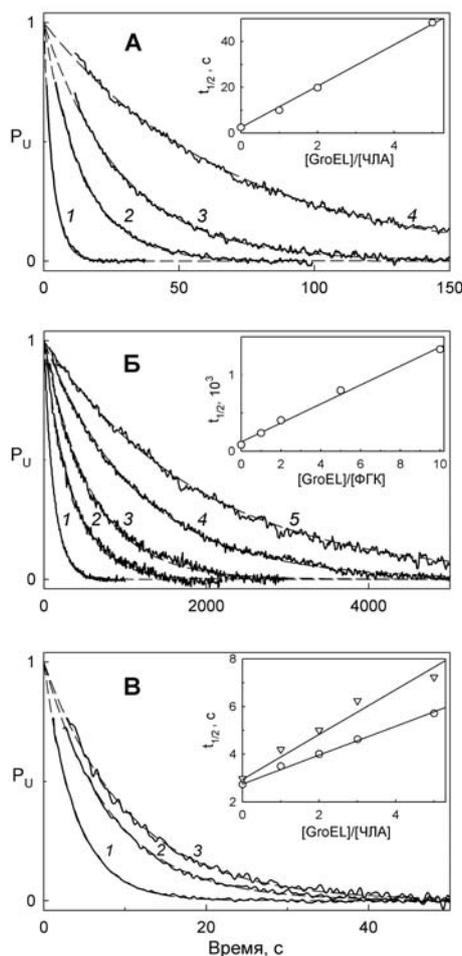
Рис. 5. Кинетики ренатурации (сворачивания *in vitro*) белков в присутствии различных молярных избытков GroEL над сворачивающимся белком.

А – кинетики ренатурации α -лактальбумина человека (ЧЛА) (1 мкМ) в присутствии 0, 1, 2 и 5 мкМ GroEL (кривые 1, 2, 3 и 4, соответственно);

Б – ренатурация дрожжевой фосфоглицераткиназы (ФГК) (1 мкМ) в присутствии 0, 1, 2, 5 и 10 мкМ GroEL (кривые 1, 2, 3, 4 и 5, соответственно).

В – ренатурация α -лактальбумина человека (ЧЛА) (1 мкМ) в присутствии 1 мМ АТФ (1), 1 мМ АТФ и 5 мкМ GroEL (2) и 1 мМ АДФ и 5 мкМ GroEL (3).

Ренатурация белков инициировалась быстрым разбавлением растворов белков из 8 М мочевины в 0.1 М мочевины (условия существования нативного состояния). Кинетики ренатурации белков регистрировались по восстановлению интенсивности собственной флуоресценции белков, характерной для нативного состояния. Пунктирные линии представляют результат моноэкспоненциальной аппроксимации кинетик ренатурации белков. По оси ординат отложена доля (популяция) ненативных молекул (P_U). Вставки представляют зависимости полувремени ренатурации белка ($t_{1/2}$) от молярного избытка GroEL над сворачивающимся белком в отсутствие нуклеотидов (А, Б) и в присутствии 1 мМ АТФ (○) и 1 мМ АДФ (▽) (В). Рисунок адаптирован из работы авторов [108].



связанными с кольцом, с которым связана белковая мишень, а, воздействуя на противоположное кольцо, обеспечивают диссоциацию белковой мишени с поверхности GroEL в раствор, где и происходит ее окончательное сворачивание. Недавно был исследован искусственно сконструированный комплекс GroEL с GroES, в котором GroES был ковалентно присоединен через гибкий линкер к одному из двух колец GroEL [110]. Это соединение было достаточно коротким, чтобы GroES блокировал проникновение белковой мишени в «ячейку Анфинсена» (т. е. в полость, образованную комплексом GroEL и GroES). Такая

конструкция могла связать полипептид только на противоположном кольце. Связывание АТФ приводило к взаимодействию GroES с GroEL, что, в свою очередь, вызывало конформационные изменения в противоположном кольце и диссоциацию белковой мишени с этого кольца в раствор. Такая искусственная система GroEL-GroES ассистировала сворачивание аконитазы с такой же скоростью, как и нормальная система GroEL+GroES дикого типа. Более того, она проявляла шаперонную активность и с меньшими по размеру субстратами, такими как бактериальный rubisco (~50 кДа) и митохондриальная малатдегидрогеназа (~30 кДа), хотя и с меньшей эффективностью, чем нормальная GroEL+GroES система [110].

Анализ имеющихся литературных данных о взаимодействии шаперонина GroEL со своими белковыми субстратами и лигандами позволяет выявить следующие более или менее доказанные закономерности:

1) GroEL взаимодействует с разнообразными полипептидными цепями различного размера, лишенными жесткой третичной структуры;

2) взаимодействие GroEL с полипептидами не является специфичным, поскольку не найден какой-либо структурный элемент, ответственный за узнавание полипептида шаперонином;

3) количество полипептидов, связанных с одной GroEL-частицей, зависит от их размера (от 14 с молекулярной массой ~2 кДа каждый до одного-двух с молекулярной массой от 20 до 100 кДа);

4) связывание полипептидов происходит на торцах GroEL-цилиндра в области верхних частей апикальных доменов, обогащенных гидрофобными остатками;

5) лиганды GroEL (Mg-АДФ, Mg-АТФ и ко-шаперонин GroES) вызывают ослабление взаимодействия шаперона с полипептидными мишенями.

Все эти закономерности можно учесть, используя более простую, чем сворачивание в «ячейке Анфинсена», модель функционирования GroEL как молекулярного шаперонина (рис. 6). Модель предполагает, что GroEL-частица может связывать разнообразные полипептидные мишени на обеих своих торцевых поверхностях. Количество связанных полипептидов зависит от их размера, а прочность связывания с GroEL определяется их «гидрофобностью» и зарядом. Таким образом, концентрация несвернутых полипептидов в свободном состоянии понижается, что должно приводить к уменьшению вероятности их неспецифической ассоциации. Тем не менее, полипептиды могут диссоциировать с поверхности GroEL и приобре-

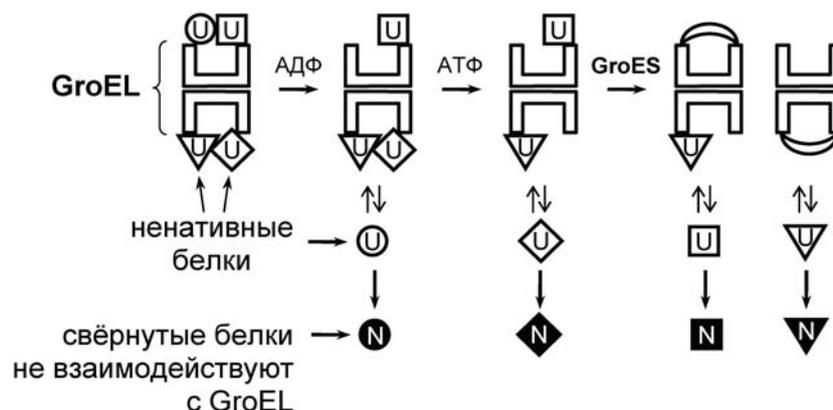


Рис. 6. Схема функционирования GroEL как молекулярного шаперона, предлагаемая авторами.

Различные символы обозначают различные полипептиды, способные связываться с GroEL с различными константами ассоциации. Взаимодействие GroEL со своими лигандами (ADP, ATP и GroES) индуцирует конформационные изменения в GroEL-частице, которые понижают ее сродство к белковым мишеням. В результате белковые мишени чаще диссоциируют с поверхности GroEL в раствор, где они либо приобретают нативную (жесткую) структуру и теряют способность взаимодействовать с GroEL, либо опять связываются с GroEL или другими клеточными факторами.

тать нативную конформацию или взаимодействовать с другими клеточными факторами в свободном состоянии. Лиганды GroEL (Mg-ADP, Mg-ATP и ко-шаперонин GroES) в различной степени ослабляют его взаимодействие с полипептидными мишенями, увеличивая тем самым время пребывания этих мишеней в свободном состоянии и, следовательно, вероятность приобретения ими нативной структуры. При этом даже в присутствии лигандов GroEL способен взаимодействовать с несвернувшимися полипептидными цепями, уменьшая тем самым вероятность их неспецифической межмолекулярной ассоциации. Такая модель не требует помещения полипептидной мишени во внутреннюю полость комплекса GroEL с GroES, в которой ее сворачивание в нативную структуру может быть проблематичным и зависеть от ее размера [111] и не накладывает ограничений на стехиометрию комплексов GroEL с белковыми мишенями. Вместе с тем такой механизм обеспечивает выполнение основной функции GroEL – «защиту» несвернутых полипептидных цепей от неспецифической межмолекулярной агрегации, которая не только препятствует приобретению ими нативной структуры, но и нарушает процессы, обеспечивающие жизнедеятельность клеток. По

такой схеме могут функционировать и другие шаперонины, которые не имеют GroES-подобных партнеров, но связывают адениловые нуклеотиды (такие как шаперонины TF55, термосома и CCT).

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературных данных по структурным и биохимическим аспектам функционирования шаперонинов позволяет поставить под сомнение универсальность модели сворачивания белков во внутренней полости шаперонинов. Хотя такая изоляция сворачивающейся белковой молекулы и привлекательна с точки зрения предотвращения нежелательных контактов белков, находящихся в сильно «гидрофобных» промежуточных состояниях, однако эта модель не может объяснить многие экспериментальные факты. Предложенная нами модель предполагает связывание белковых мишеней с шаперонином и диссоциацию с его поверхности, а также спонтанное сворачивание белка в свободном состоянии. Функция шаперонинов сводится к «удержанию» около себя белков, находящихся в «гидрофобных» промежуточных состояниях, и, тем самым, к уменьшению вероятности их неспецифической ассоциации. Лиганды шаперонинов понижают их сродство к ненативным полипептидным цепям, предотвращая формирование «долгоживущих» комплексов, которые невыгодны для быстрого восстановления клеточных процессов после стресса. Можно предположить, что кольцевая олигомерная структура шаперонинов предназначена не столько для образования обширной внутренней полости, сколько для формирования множественных «гидрофобных» центров связывания, способных удерживать на себе большие молекулы денатурированных белков. Кроме того, шаперонины должны «защищать» самих себя от неспецифической ассоциации по этим «гидрофобным» центрам. Возможно, именно поэтому они эволюционировали как большие олигомерные комплексы, сильно заряженные при нейтральных pH и обладающие хорошей растворимостью даже при больших концентрациях. Дальнейшее изучение свойств как мономерных, так и олигомерных шаперонов из различных организмов позволит более определенно выяснить механизмы участия шаперонов в процессах созревания и транспорта белковых молекул в клетке.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Seckler, R. and Jaenicke, R.* (1992) *FASEB J.*, **6**, 2545–2552.
2. *Gething, M.J. and Sambrook, J.* (1992) *Nature*, **355**, 33–45.
3. *Freedman, R.B.* (1992) Protein Folding in the Cell. In *Protein Folding.* / Edited by Creighton, T.E. New York: WH Freeman, 457–541.
4. *Ellis, J.* (1987) *Nature*, **328**, 378–379.
5. *Lindquist, S. and Craig, E.A.* (1988) *Annu. Rev. Genet.*, **22**, 631–677.
6. *Gething, M.-J.* (ed.) (1997) *Guidebook to Molecular Chaperones and Protein-Folding Catalysts* / Oxford: Oxford University Press, 584 p.
7. *Roseman, A.M., Chen, S., White, H., Braig, K., and Saibil, H.R.* (1996) *Cell*, **87**, 241–251.
8. *Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L., and Sigler, P.B.* (1994) *Nature*, **371**, 578–586.
9. *Kim, K.K., Kim, R., and Kim, S.H.* (1998) *Nature*, **394**, 595–599.
10. *van Montfort, R.L., Basha, E., Friedrich, K.L., Slingsby, C., and Vierling, E.* (2001) *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 1025–1030.
11. *Saibil, H. and Wood, S.* (1993) *Current Opinion in Structural Biology*, **3**, 207–213.
12. *Bukau, B. and Horwich, A.L.* (1998) *Cell*, **92**, 351–366.
13. *Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M.* (2002) *Science*, **295**, 1852–1858.
14. *Gusev, N.B., Bogatcheva, N.V., and Marston, S.B.* (2002) *Biochemistry (Mosc.)*, **67**, 511–519.
15. *Hemmingsen, S.M., Woolford, C., van, d., V, Tilly, K., Dennis, D.T., Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., and Ellis, R.J.* (1988) *Nature*, **333**, 330–334.
16. *Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., Casjens, S.R., and Kaiser, A.D.* (1973) *J. Mol. Biol.*, **76**, 45–60.
17. *Sternberg, N.* (1973) *J. Mol. Biol.*, **76**, 25–44.
18. *Herendeen, S.L., VanBogelen, R.A., and Neidhardt, F.C.* (1979) *J. Bacteriol.*, **139**, 185–194.
19. *Bochkareva, E.S., Lissin, N.M., and Girshovich, A.S.* (1988) *Nature*, **336**, 254–257.
20. *Hartl, F.U. and Martin, J.* (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **5**, 92–102.
21. *Horwich, A.L., Low, K.B., Fenton, W.A., Hirshfield, I.N., and Furtak, K.* (1993) *Cell*, **74**, 909–917.
22. *Ewalt, K.L., Hendrick, J.P., Houry, W.A., and Hartl, F.U.* (1997) *Cell*, **90**, 491–500.
23. *Fayet, O., Ziegelhoffer, T., and Georgopoulos, C.* (1989) *J. Bacteriol.*, **171**, 1379–1385.
24. *Viitanen, P.V., Gatenby, A.A., and Lorimer, G.H.* (1992) *Protein Sci.*, **1**, 363–369.
25. *Buchner, J., Schmidt, M., Fuchs, M., Jaenicke, R., Rudolph, R., Schmid, F.X., and Kiefhaber, T.* (1991) *Biochemistry*, **30**, 1586–1591.
26. *Goloubinoff, P., Christeller, J.T., Gatenby, A.A., and Lorimer, G.H.* (1989) *Nature*, **342**, 884–889.
27. *Xu, Z., Horwich, A.L., and Sigler, P.B.* (1997) *Nature*, **388**, 741–750.
28. *Braig, K., Adams, P.D., and Brunger, A.T.* (1995) *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 1083–1094.
29. *Boisvert, D.C., Wang, J., Otwinowski, Z., Horwich, A.L., and Sigler, P.B.* (1996) *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 170–177.
30. *Fenton, W.A., Kashi, Y., Furtak, K., and Horwich, A.L.* (1994) *Nature*, **371**, 614–619.

31. Langer, T., Pfeifer, G., Martin, J., Baumeister, W., and Hartl, F.U. (1992) *EMBO J.*, **11**, 4757–4765.
32. Braig, K., Simon, M., Furuya, F., Hainfeld, J.F., and Horwich, A.L. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 3978–3982.
33. Chen, S., Roseman, A.M., Hunter, A.S., Wood, S.P., Burston, S.G., Ranson, N.A., Clarke, A.R., and Saibil, H.R. (1994) *Nature*, **371**, 261–264.
34. Ishii, N., Taguchi, H., Sasabe, H., and Yoshida, M. (1994) *J. Mol. Biol.*, **236**, 691–696.
35. Thiyagarajan, P., Henderson, S.J., and Joachimiak, A. (1996) *Structure*, **4**, 79–88.
36. Hunt, J.F., Weaver, A.J., Landry, S.J., Gierasch, L., and Deisenhofer, J. (1996) *Nature*, **379**, 37–45.
37. Cheng, M.Y., Hartl, F.U., Martin, J., Pollock, R.A., Kalousek, F., Neupert, W., Hallberg, E.M., Hallberg, R.L., and Horwich, A.L. (1989) *Nature*, **337**, 620–625.
38. Leroux, M.R. and Candido, E.P. (1995) *DNA Cell Biol.*, **14**, 951–960.
39. Kubota, H., Hynes, G., Carne, A., Ashworth, A., and Willison, K. (1994) *Curr. Biol.*, **4**, 89–99.
40. Phipps, B.M., Typke, D., Hegerl, R., Volker, S., Hoffmann, A., Stetter, K.O., and Baumeister, W. (1993) *Nature*, **361**, 475–477.
41. Trent, J.D., Nimmesgern, E., Wall, J.S., Hartl, F.U., and Horwich, A.L. (1991) *Nature*, **354**, 490–493.
42. Knapp, S., Schmidt-Krey, I., Hebert, H., Bergman, T., Jornvall, H., and Ladenstein, R. (1994) *J. Mol. Biol.*, **242**, 397–407.
43. Lewis, V.A., Hynes, G.M., Zheng, D., Saibil, H., and Willison, K. (1992) *Nature*, **358**, 249–252.
44. Kubota, H., Hynes, G., and Willison, K. (1995) *Eur. J. Biochem.*, **230**, 3–16.
45. Phipps, B.M., Hoffmann, A., Stetter, K.O., and Baumeister, W. (1991) *EMBO J.*, **10**, 1711–1722.
46. Rommelaere, H., Van Troys, M., Gao, Y., Melki, R., Cowan, N.J., Vandekerckhove, J., and Ampe, C. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 11975–11979.
47. Gao, Y., Thomas, J.O., Chow, R.L., Lee, G.H., and Cowan, N.J. (1992) *Cell*, **69**, 1043–1050.
48. Lewis, S.A., Tian, G., Vainberg, I.E., and Cowan, N.J. (1996) *J. Cell Biol.*, **132**, 1–4.
49. Yaffe, M.B., Farr, G.W., Miklos, D., Horwich, A.L., Sternlicht, M.L., and Sternlicht, H. (1992) *Nature*, **358**, 245–248.
50. Thulasiraman, V., Yang, C.F., and Frydman, J. (1999) *EMBO J.*, **18**, 85–95.
51. Dunn, A.Y., Melville, M.W., and Frydman, J. (2001) *J. Struct. Biol.*, **135**, 176–184.
52. Roobol, A., Holmes, F.E., Hayes, N.V., Baines, A.J., and Carden, M.J. (1995) *J. Cell Sci.*, **108**, 1477–1488.
53. Hohn, T., Hohn, B., Engel, A., Wurtz, M., and Smith, P.R. (1979) *J. Mol. Biol.*, **129**, 359–373.
54. Tsuprun, V.L., Boekema, E.J., Pushkin, A.V., and Tagunova, I.V. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1099**, 67–73.
55. Carazo, J.M., Marco, S., Abella, G., Carrascosa, J.L., Secilla, J.P., and Muyal, M. (1991) *J. Struct. Biol.*, **106**, 211–220.
56. Hutchinson, E.G., Tichelaar, W., Hofhaus, G., Weiss, H., and Leonard, K.R. (1989) *EMBO J.*, **8**, 1485–1490.
57. Viitanen, P.V., Lorimer, G.H., Seetharam, R., Gupta, R.S., Oppenheim, J., Thomas, J.O., and Cowan, N.J. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 695–698.
58. Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Stetter, K.O., Huber, H., Huber, R., and Steinbacher, S. (1998) *Cell*, **93**, 125–138.

59. Fukami, T.A., Yohda, M., Taguchi, H., Yoshida, M., and Miki, K. (2001) *J. Mol. Biol.*, **312**, 501–509.
60. Shomura, Y., Yoshida, T., Iizuka, R., Maruyama, T., Yohda, M., and Miki, K. (2004) *J. Mol. Biol.*, **335**, 1265–1278.
61. Buckle, A.M., Zahn, R., and Fersht, A.R. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 3571–3575.
62. Chen, L. and Sigler, P.B. (1999) *Cell*, **99**, 757–768.
63. Houry, W.A., Frishman, D., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., and Hartl, F.U. (1999) *Nature*, **402**, 147–154.
64. Chaudhuri, T.K., Farr, G.W., Fenton, W.A., Rospert, S., and Horwich, A.L. (2001) *Cell*, **107**, 235–246.
65. Katsumata, K., Okazaki, A., Tsurupa, G.P., and Kuwajima, K. (1996) *J. Mol. Biol.*, **264**, 643–649.
66. Martin, J., Langer, T., Boteva, R., Schramel, A., Horwich, A.L., and Hartl, F.U. (1991) *Nature*, **352**, 36–42.
67. Perrett, S., Zahn, R., Stenberg, G., and Fersht, A.R. (1997) *J. Mol. Biol.*, **269**, 892–901.
68. Lin, Z., Schwartz, F.P., and Eisenstein, E. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 1011–1014.
69. Aoki, K., Taguchi, H., Shindo, Y., Yoshida, M., Ogasahara, K., Yutani, K., and Tanaka, N. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 32158–32162.
70. Song, J.L., Li, J., Huang, Y.S., and Chuang, D.T. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 2515–2521.
71. Hayer-Hartl, M.K., Ewbank, J.J., Creighton, T.E., and Hartl, F.U. (1994) *EMBO J.*, **13**, 3192–3202.
72. Katsumata, K., Okazaki, A., and Kuwajima, K. (1996) *J. Mol. Biol.*, **258**, 827–838.
73. Viitanen, P.V., Lubben, T.H., Reed, J., Goloubinoff, P., O'Keefe, D.P., and Lorimer, G.H. (1990) *Biochemistry*, **29**, 5665–5671.
74. Марченко, Н.Ю. (2006) Вестн. Харьк. ун-та. Серия:Биология. В печати.
75. Richarme, G. and Kohiyama, M. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 7095–7098.
76. Landry, S.J. and Gierasch, L.M. (1991) *Biochemistry*, **30**, 7359–7362.
77. Landry, S.J., Jordan, R., McMacken, R., and Gierasch, L.M. (1992) *Nature*, **355**, 455–457.
78. Chatellier, J., Hill, F., Lund, P.A., and Fersht, A.R. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 9861–9866.
79. Chatellier, J., Buckle, A.M., and Fersht, A.R. (1999) *J. Mol. Biol.*, **292**, 163–172.
80. Keskin, O., Bahar, I., Flatow, D., Covell, D.G., and Jernigan, R.L. (2002) *Biochemistry*, **41**, 491–501.
81. Gomez-Puertas, P., Martin-Benito, J., Carrascosa, J.L., Willison, K.R., and Valpuesta, J.M. (2004) *J. Mol. Recognit.*, **17**, 85–94.
82. Lau, C.K. and Churchich, J.E. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1431**, 282–289.
83. Pack, C.G., Nishimura, G., Tamura, M., Aoki, K., Taguchi, H., Yoshida, M., and Kinjo, M. (1999) *Cytometry*, **36**, 247–253.
84. Schmidt, M., Rutkat, K., Rachel, R., Pfeifer, G., Jaenicke, R., Viitanen, P., Lorimer, G., and Buchner, J. (1994) *Science*, **265**, 656–659.
85. Jackson, G.S., Staniforth, R.A., Halsall, D.J., Atkinson, T., Holbrook, J.J., Clarke, A.R., and Burston, S.G. (1993) *Biochemistry*, **32**, 2554–2563.
86. Burston, S.G., Ranson, N.A., and Clarke, A.R. (1995) *J. Mol. Biol.*, **249**, 138–152.
87. Staniforth, R.A., Burston, S.G., Atkinson, T., and Clarke, A.R. (1994) *Biochem. J.*, **300 (Pt 3)**, 651–658.
88. Bochkareva, E.S., Lissin, N.M., Flynn, G.C., Rothman, J.E., and Girshovich, A.S. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 6796–6800.

89. Todd, M.J., Viitanen, P.V., and Lorimer, G.H. (1994) *Science*, **265**, 659–666.
90. Llorca, O., Carrascosa, J.L., and Valpuesta, J.M. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 68–76.
91. Hansen, J.E. and Gafni, A. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 21632–21636.
92. Badcoe, I.G., Smith, C.J., Wood, S., Halsall, D.J., Holbrook, J.J., Lund, P., and Clarke, A.R. (1991) *Biochemistry*, **30**, 9195–9200.
93. Schmidt, M. and Buchner, J. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 16829–16833.
94. Fisher, M.T. (1992) *Biochemistry*, **31**, 3955–3963.
95. Viitanen, P.V., Donaldson, G.K., Lorimer, G.H., Lubben, T.H., and Gatenby, A.A. (1991) *Biochemistry*, **30**, 9716–9723.
96. Martin, J., Mayhew, M., Langer, T., and Hartl, F.U. (1993) *Nature*, **366**, 228–233.
97. Hartl, F.U. (1994) *Nature*, **371**, 557–559.
98. Mayhew, M., da Silva, A.C., Martin, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Hartl, F.U. (1996) *Nature*, **379**, 420–426.
99. Brinker, A., Pfeifer, G., Kerner, M.J., Naylor, D.J., Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2001) *Cell*, **107**, 223–233.
100. Chen, H., Zhou, X., and Ou-Yang, Z.C. (2001) *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft. Matter Phys.*, **64**, 041905–
101. Grallert, H., Rutkat, K., and Buchner, J. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 20424–20430.
102. Weissman, J.S., Rye, H.S., Fenton, W.A., Beechem, J.M., and Horwich, A.L. (1996) *Cell*, **84**, 481–490.
103. Grantham, J., Llorca, O., Valpuesta, J.M., and Willison, K.R. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 4587–4591.
104. Марченко Н.Ю., Марченко В.В., Котова Н.В., Семисотнов Г.В., Буланкина Н.И. и Калиман П.А. (2003) *Укр. биохим. журн.*, **75**, 88–94.
105. Марченко Н.Ю., Марченко В.В., Котова Н.В., Калиман П.А. и Семисотнов Г.В. (2005) *Вестн. Харьк. ун-та. Биофизический вестник*, **665**, 53–56.
106. Gekko, K., Kimoto, A., and Kamiyama, T. (2003) *Biochemistry*, **42**, 13746–13753.
107. Козлов Л.В., Мецерьякова Е.А., Завада Л.Л., Ефремов Е.С. и Раиш-ковецкий Л.Г. (1979) *Биохимия*, **44**, 338–349.
108. Марченко В.В., Соколовский И.В., Котова Н.В., Галзитская О.В., Бочкарева Е.С., Гиршович А.С. и Семисотнов Г.В. (2004) *Биофизика*, **49**, 987–994.
109. Makio, T., Arai, M., and Kuwajima, K. (1999) *J. Mol. Biol.*, **293**, 125–137.
110. Farr, G.W., Fenton, W.A., Chaudhuri, T.K., Clare, D.K., Saibil, H.R., and Horwich, A.L. (2003) *EMBO J.*, **22**, 3220–3230.
111. Tang, Y.C., Chang, H.C., Roeben, A., Wischnewski, D., Wischnewski, N., Kerner, M.J., Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2006) *Cell*, **125**, 903–914.