

## СТРУКТУРА И СВОЙСТВА МАЛЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА

© 2003 г. О. О. ПАНАСЕНКО, М. В. КИМ,  
Н. Б. ГУСЕВ

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
Москва*

I. Введение. II. Малые белки теплового шока. III. Механизм сборки олигомеров. IV. Строение и свойства олигомерных комплексов. V. Фосфорилирование малых белков теплового шока. VI. Шаперонная активность. VII. Участие малых белков теплового шока в поддержании нормальной жизнедеятельности и программируемой гибели клеток. VIII. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

В 1974 году Тиссиерес и соавт. [169] впервые обнаружили, что в ответ на повышение температуры среды у личинок дрозофилы происходит активация синтеза специфической группы белков. Эта группа белков получила название белков теплового шока (heat shock proteins, Hsp). Позже было установлено, что синтез этих белков индуцируется не только при повышении температуры, но и при многих других неблагоприятных воздействиях, таких как добавление к клеткам органических растворителей, тяжелых металлов, сильных оксидантов, а также под влиянием некоторых гормонов и ростовых факторов. В связи с этим некоторые авторы называют белки теплового шока стресс-белками. Этот термин не совсем удачный, потому что и в нормальных условиях клетки синтезируют большое количество таких белков. Это обусловлено тем, что белки теплового шока играют важную роль в процессах сворачивания полипептидной цепи вновь синтезированных белков, а также участвуют в процессах репарации или элиминации неправильно свернутых или денатурирован-

---

*Принятые сокращения:* Hsp (heat shock proteins) — белки теплового шока; sHsp (small heat shock proteins) — малые белки теплового шока; ПК — протеинкиназа.

*Адрес для корреспонденции:* e-mail: NBGusev@mail.ru

Работа поддержана грантами РФФИ № 01-04-48117 и Welcome Trust # 064581/Z/01/Z.

ных белков. Вероятно, именно поэтому белки теплового шока обнаружены во всех организмах от бактерий до человека и относятся к группе наиболее консервативных белков.

Согласно современной классификации, в основу которой положены различия в молекулярных массах, выделяют пять основных классов Hsp: Hsp100, 90, 70, 60 и малые Hsp (small Hsp, sHsp) [10, 101, 126]. Каждый из этих классов белков теплового шока выполняет характерные функции. Так, белки семейства Hsp70 (как и их бактериальный аналог DnaK), взаимодействуют с вновь синтезируемой на рибосомах полипептидной цепью, предотвращают преждевременное неправильное сворачивание незрелой полипептидной цепи и участвуют в транспорте белка к определенным органеллам (митохондриям, эндоплазматическому ретикулуму и т.д.) [121]. Белки класса Hsp100 являются близкими родственниками белков теплового шока с молекулярной массой 70 кДа и выполняют защитную функцию, предохраняя организм в условиях стресса [102, 127]. Hsp90 образуют сложный комплекс с несколькими вспомогательными белками (т.н. ко-шаперонами). Такой комплекс взаимодействует с рецепторами стероидных гормонов, обеспечивает эффективное связывание гормона с рецепторами и последующий перенос гормон-рецепторного комплекса в ядро. Помимо этого, белки класса Hsp90 участвуют в направленном переносе нескольких типов протеинкиназ к участкам их функционирования [36]. Белки семейства Hsp60 могут участвовать в фолдинге сложно устроенных многодоменных белков (таких как актин или тубулин), а также в АТФ-зависимом исправлении ошибок в структуре частично денатурированных белков [121]. К последней группе белков теплового шока относятся Hsp с малыми молекулярными массами (sHsp), выполняющие множество разных функций в клетке [2, 42, 43, 105]. Данный обзор посвящен описанию структуры, свойств и некоторых функций, выполняемых малыми белками теплового шока в различных клетках.

## II. МАЛЫЕ БЕЛКИ ТЕПЛООВОГО ШОКА

Малые белки теплового шока — очень большая и гетерогенная группа, объединяющая в своем составе белки с молекулярными массами от 12 до 43 кДа. Все эти довольно разнородные белки объединены в одну группу потому, что имеют в своей структуре высоко консервативный участок, который впервые был обнаружен в  $\alpha$ -кристаллинах хрусталика глаза и получил обозначение кристаллинового домена [67]. Малые белки теплового шока обнаружены у архей, бактерий, растений и животных, при этом в тканях многих видов бак-

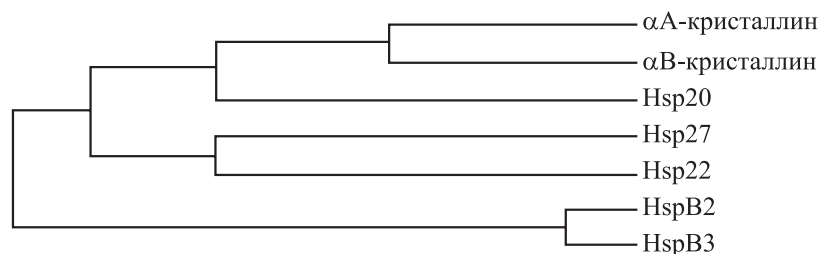


Рис. 1. Филогенетическое дерево малых белков теплового шока человека.

Сравнение первичных структур белков, представленных в базе данных SwissProt, проведено с помощью программы DNA-Star.  $\alpha$ A-(P02489) и  $\alpha$ B-кристаллины (P02511), Hsp20 (Q96MG9), Hsp27 (P04792), и Hsp22 (Q9UJY1) образуют семейство I, а HspB2 (Q16082) и HspB3 (Q12988) относятся к семейству II.

терий, животных и растений малые белки кодируются несколькими генами. Например, у некоторых видов млекопитающих выявлено до 7 генов малых белков теплового шока.

Анализ первичной структуры позволил выявить определенные родственные отношения и построить филогенетическое дерево малых белков теплового шока. Проанализируем гомологии, выявленные в структуре sHsp, на примере малых белков теплового шока из тканей млекопитающих. В настоящее время принято считать, что в тканях млекопитающих экспрессируется семь (в последнее время говорится даже о восьми [77]) типов sHsp, которые разделяют либо по молекулярной массе, либо по функциям, выполняемым этими белками в клетке. Различают  $\alpha$ A- и  $\alpha$ B-кристаллины, малые белки теплового шока с молекулярными массами 25/27 кДа, 22 и 20 кДа, а также так называемые белки HspB2/МКВР (myosin dystrophy kinase binding protein), белки-активаторы протеинкиназы, характерной для скелетных мышц с миотонической дистрофией и HspB3 [12, 150, 163]. Используя программу DNASTar для поиска гомологий первичных структур белков, представленных в базе данных SwissProt, мы построили филогенетическое дерево для sHsp из тканей человека (рис. 1). Как видно из рис. 1, наибольшие гомологии характерны для  $\alpha$ A- и  $\alpha$ B-кристаллинов. В эту же группу попадает малый белок теплового шока с молекулярной массой 20 кДа. Вторая близкородственная группа состоит из Hsp25/27 и Hsp22. Две первых группы белков довольно сходны по первичной структуре и образуют большое семейство I. Во второе крупное семейство попадают HspB2 и HspB3. Как будет показано позже, белки, принадлежащие к одному семейству, способны образовывать гетереолигомерные комплексы, в то время как белки, принадлежащие разным семействам, по всей видимости,

слабо взаимодействуют между собой и не склонны к образованию гетероолигомеров [163].

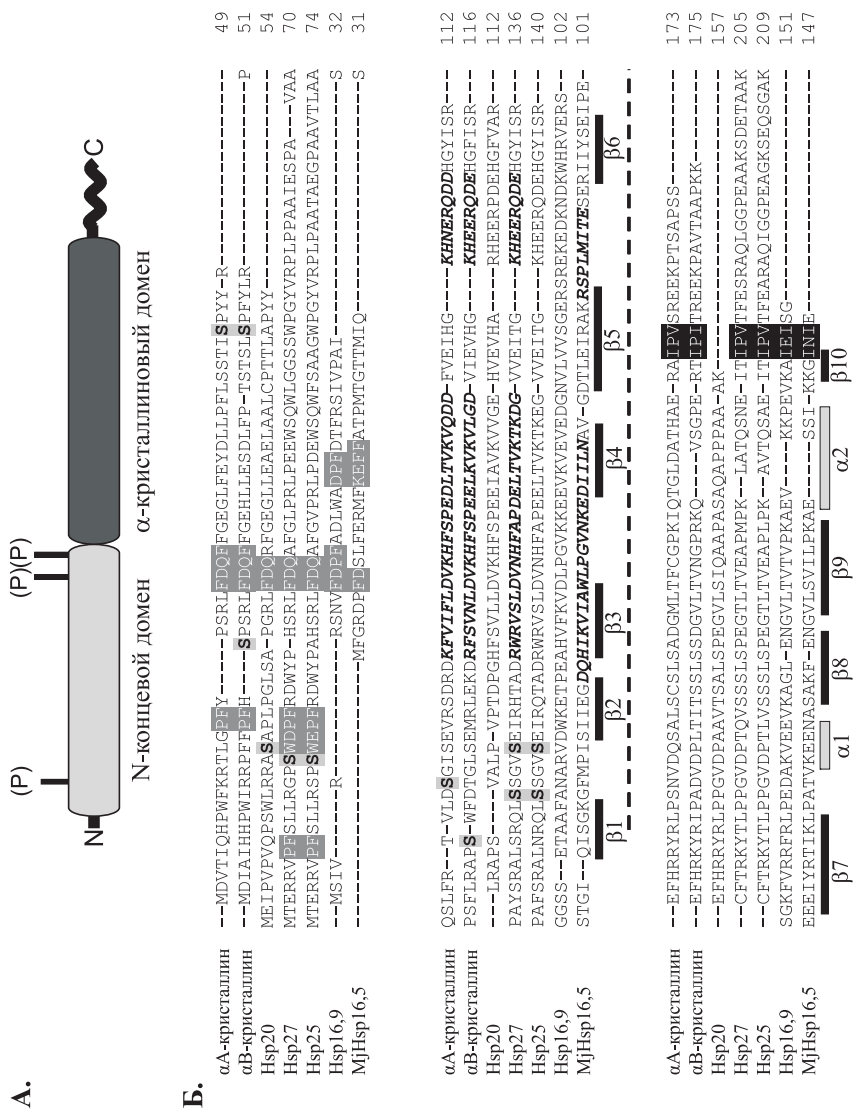
Некоторые из перечисленных малых белков теплового шока экспрессируются практически во всех органах и тканях, другие – наоборот, экспрессируются только в определенных тканях. Например, Hsp25/27 в сравнительно больших количествах экспрессируется практически во всех исследованных тканях (скелетные, сердечные и гладкие мышцы, трахея, печень, легкие, мозг, селезенка и т.д.) [1, 82, 117]. Примерно такое же широкое распространение характерно для  $\alpha$ B-кристаллина, который синтезируется не только в хрусталике глаза, но и в различных типах мышц, мозге, легких, коже, почках и других органах [64].  $\alpha$ A-кристаллин преимущественно синтезируется в хрусталике глаза [40, 83, 157], где на его долю приходится до 40% всего белка [64]. Есть данные о тканевом распределении Hsp20 [79, 163] и Hsp22 [12], при этом отмечается, что оба этих белка, так же как и сравнительно недавно описанный новый малый белок теплового шока, получивший обозначение Hsp<sub>cv</sub> (от cardio-vascular) [89], преимущественно синтезируются в различных мышечных тканях. Любопытно отметить, что малые белки теплового шока, относящиеся ко второму семейству, HspB2 и HspB3, также преимущественно синтезируются в скелетной и сердечной мышце [163]. Вообще, по не вполне понятным причинам, мышечные ткани содержат самое большое количество практически всех малых белков теплового шока, за исключением  $\alpha$ A-кристаллина [82, 84, 116].

Сравнительный анализ первичной структуры sHsp показал, что, по-видимому, эти белки произошли от общего предка путем дупликации генов [43]. Основываясь на экзон-интронной структуре гена, в составе sHsp можно выделить два домена (рис. 2А). N-Концевой

Рис. 2. Схема строения и первичная структура малых белков теплового шока.

А. Схема строения sHsp. Обозначены N-концевой и С-концевой ( $\alpha$ -кристаллиновый) домены и варибельная С-концевая последовательность. Буквой Р обозначены участки фосфорилирования.

Б. Сравнение первичной структуры малых белков теплового шока по данным SWISS-PROT.  $\beta$ A-кристаллин человека (P02489);  $\beta$ B-кристаллин человека (P02511); Hsp20 человека (Q96MG9); Hsp27 человека (P04792); Hsp25 мыши (P14602); hsp16,9 из пшеницы (P12810); Hsp16,5 из *M. jannaschii* (Q57733). Внизу обозначены  $\beta$ -спирали и  $\beta$ -слои Hsp16,5 из *M. jannaschii*. Пунктирной линией обозначен  $\beta$ -кристаллиновый домен Hsp16,5 из *Methanococcus jannaschii*. Остатки серина (S), выделенные жирным шрифтом, подвергаются фосфорилированию. Серым цветом выделены WDPF-мотивы в N-концевом домене малых белков теплового шока. Жирным курсивом отмечены SCM1 и SCM2 мотивы. Черным квадратом отмечена консервативная последовательность в варибельном С-концевом участке.



домен sHsp кодируется экзоном 1, а С-концевой или  $\alpha$ -кристаллиновый домен кодируется экзонами 2 и 3.

N-концевой домен состоит приблизительно из 80 аминокислотных остатков. В целом этот домен не очень консервативен, однако на самом N-конце домена располагается относительно консервативная последовательность аминокислот [90, 91]. Этот участок или т.н. WDPF-мотив имеет вид (W/F)(D/F)PF (см. рис. 1). В структуре некоторых малых белков теплового шока присутствуют два WDPF-мотива, разделенных вставкой из нескольких аминокислотных остатков (обычно 4–8). Помимо WDPF-мотива у большинства sHsp есть еще один довольно консервативный и короткий участок, расположенный в N-концевом домене между WDPF-мотивом и  $\alpha$ -кристаллиновым доменом [163]. У sHsp хлоропластов есть уникальная последовательность, расположенная в конце N-концевого домена, характерная только для пластидных sHsp. Эта последовательность состоит приблизительно из 26 аминокислотных остатков и богата метионином. Для всех sHsp хлоропластов этот участок очень консервативен и, по всей видимости, участвует в распознавании субстратов [177]. Вторичная структура N-концевого домена sHsp представлена тремя короткими  $\alpha$ -спиралями и значительным количеством неупорядоченных структур [86].

В С-концевой части sHsp располагается  $\alpha$ -кристаллиновый домен, состоящий из 80–100 аминокислотных остатков. В отличие от N-концевого домена эта последовательность высоко консервативна – Hsp27 человека на 78% гомологичен  $\alpha$ A-кристаллину мыши и на 86% гомологичен  $\alpha$ B-кристаллину быка [91]. В состав  $\alpha$ -кристаллинового домена входит девять  $\beta$ -тяжей, собранных в два  $\beta$ -листа и короткая  $\alpha$ -спираль, расположенная между седьмым и восьмым  $\beta$ -тяжами (рис. 2Б).

На самом С-конце молекулы располагается короткая, переменная последовательность, которая по данным ЯМР спектроскопии характеризуется высокой подвижностью и экспонирована из гидрофобного С-концевого домена в растворитель [90, 98]. В этой последовательности удается выявить  $\alpha$ -спираль ( $\alpha 2$ ), короткую  $\beta$ -складку ( $\beta 10$ ) и достаточно протяженные участки неупорядоченной структуры.

Завершая этот раздел, можно заключить, что согласно предсказаниям и экспериментальным результатам вторичная структура малых белков теплового шока представлена преимущественно  $\beta$ -складками, в то время как доля  $\alpha$ -спиралей относительно мала [98, 131, 137, 164]. Действительно, согласно расчетам в молекуле Hsp25 и  $\alpha$ B-кристаллине мыши на долю  $\beta$ -тяжей приходится 42–46%, тогда как на долю  $\alpha$ -спиралей — от 2 до 12% структуры [98, 131]. До настоя-

щего времени в литературе нет данных о третичной структуре изолированных мономеров sHsp. Это связано с тем, что большая часть sHsp образует прочные олигомерные комплексы, что делает практически невозможным выделение и кристаллизацию мономеров этих белков. Остановимся на механизме сборки и структуре олигомеров sHsp.

### III. МЕХАНИЗМ СБОРКИ ОЛИГОМЕРОВ

Важным свойством всех малых белков теплового шока является их способность образовывать крупные олигомерные комплексы с молекулярной массой от 100 до 1000 кДа. В условиях стресса размер этих комплексов может возрасти до 5000 кДа. Олигомеры sHsp млекопитающих обладают очень динамичной структурой, и, вероятно, поэтому закристаллизовать и исследовать их структуру с помощью рентгеноструктурного анализа до сих пор не удавалось. Сведения об олигомерной структуре sHsp получены в основном из данных рентгеноструктурного анализа Hsp16,5 из термофильной археи *Methanococcus jannaschii* [86] и Hsp16,9 из пшеницы [170]. Олигомерный комплекс Hsp16,5 из *M. jannaschii* имеет массу около 400 кДа, состоит из 24 субъединиц и представляет собой сферу с внешним диаметром, равным 120 ангстрем. Внутри этой сферы имеется полость с диаметром 65 ангстрем. Олигомер Hsp16,5 обладает октаэдрической симметрией, и на его поверхности находятся восемь треугольных и шесть квадратных отверстий (рис. 3В, см. цветную вкладку на стр. 81) [86]. Олигомерный комплекс Hsp16,9 из пшеницы состоит из 12 субъединиц, организованных в 2 кольца, в каждом из которых располагается тример димеров Hsp16,9 (рис. 3Г, см. стр. 81) [170].

Данные рентгеноструктурного анализа свидетельствуют в пользу того, что димер является наименьшей структурной единицей в олигомерах обоих закристаллизованных sHsp [86, 170]. Аналогичные выводы были сделаны при исследовании структуры  $\alpha$ В-кристаллинов методом рентгеновского рассеяния синхротронного излучения [48]. Важнейшую роль в стабилизации димера играют взаимодействия между  $\alpha$ -кристаллиновыми доменами. В экспериментах по сайт-направленному мутагенезу, с последующей модификацией ЭПР-метками было установлено, что димеры формируются в основном за счет контактов между  $\beta$ -складчатыми структурами, принадлежащими  $\alpha$ -кристаллиновым доменам двух соседних субъединиц [13, 14, 88, 108]. Анализ кристаллов Hsp16,5 из *M. jannaschii* [86] и Hsp16,9 из пшеницы [170] позволил детально изучить структуру димера малых белков теплового шока. Как уже отмечалось, каждый мономер содержит десять  $\beta$ -складок и две короткие  $\alpha$ -спирали (рис. 2, 3А). Девять



<b>SCM1</b>	<b>SCM2</b>
<b>αA-кристаллин</b>	<b>αA-кристаллин</b>
70-KFVIFLDVKHFS PEDLTVKVQDD-92	99-KHNERQDD-106
92-DDQVKVTLDEPSFHKVDLFI VFK-70	106-DDQRENHK-99
<b>αB-кристаллин</b>	<b>αB-кристаллин</b>
74-RFSVNL DVKHFSPEELKVKVLGD-92	103-KHBERQDE-110
92-DGLVVKVLEEPSFHKVDLNV SFR-70	110-EDQREBHK-103
<b>Hsp27</b>	<b>Hsp27</b>
94-RWRVSLDVNH FAPDELTVKTKDG-116	123-KHBERQDE-130
116-GDKTKVTL EDPAFHNVDLSVRWR-94	130-EDQREBHK-123
<b>MjHsp16,5</b>	<b>MjHsp16,5</b>
51-DQH I KVI AWLPGVNKEDIILN-71	83-RSPLMITE-90
71-NLIIDEKNVGPLWAI VKIHQD-51	90-ETIMLPSR-83

Рис. 4. SCM1 и SCM2 мотивы в структуре малых белков теплового шока на примере αA- и αB-кристаллинов, Hsp27 человека и Hsp16,5 из *M. jannaschii* (MjHsp16,5). Аминокислотные остатки, участвующие в образовании ионных пар, водородных связей и гидрофобных контактов отмечены разным фоном (по [47] с незначительными модификациями).

из десяти β-складок каждого мономера располагаются в два параллельных слоя: один формируется складками β1, β4, β5 и β7, а второй – складками β2, β3, β8, β9 и β6. При этом β6-складка во втором слое принадлежит второму мономеру Hsp. Таким образом, димер sHsp можно представить в виде двух β-сендвичей, в которых одна из складок принадлежит соседнему мономеру (рис. 3А). У αB-кристаллина млекопитающих участок димеризации выглядит несколько по-иному, потому что в этом белке шестая β-складка разбита на два относительно коротких участка, что обеспечивает более плотный контакт мономеров [48].

Анализ первичной структуры α-кристаллиновых доменов sHsp выявил наличие двух самокомплементарных участков, т.н. SCM1 и SCM2-мотивов (SCM — self-complementary motif) (рис. 4) [47]. Была высказана гипотеза, что в пространстве SCM-мотив одного мономера располагается антипараллельно SCM-мотиву другого мономера sHsp так, что полярные аминокислотные остатки формируют солевые



мостики, а за счет неполярных остатков осуществляются гидрофобные контакты. Мотив SCM1 представляет собой последовательность, состоящую из 20–22 аминокислотных остатков. Эта последовательность включает в себя  $\beta 3$  и  $\beta 4$ -складки и соединяющую их линкерную область, и играет важную роль в стабилизации  $\beta$ -сендвича, образованного двумя мономерами sHsp. Мотив SCM2 приблизительно в два раза короче, чем SCM1, и состоит из 7–13 аминокислотных остатков. В sHsp млекопитающих мотив SCM2 располагается в линкерной области между 5 и 6-ой  $\beta$ -складками, захватывает N-концевую часть шестой  $\beta$ -складки (т.н. складку  $\beta 6.1$ ) и обеспечивает плотный контакт мономеров в димере [48]. По всей видимости, SCM-мотивы играют важную роль в образовании и стабилизации димеров sHsp. В олигомере Hsp16,5 из *M. jannaschii* мотив SCM2 формирует стороны восьми треугольных отверстий и располагается на поверхности вблизи шести квадратных отверстий [86]. Таким образом, мотив SCM2 может участвовать в узнавании субстратов и в межсубъединичных контактах в составе олигомерного комплекса малых белков теплового шока.

В настоящее время нет сомнений в том, что  $\alpha$ -кристаллиновый домен участвует в образовании димеров (или тетрамеров) sHps. Действительно, изолированные C-концевые фрагменты (аминокислотные остатки 64–173)  $\alpha$ A-кристаллина способны образовывать димеры и димеры димеров (тетрамеры) в растворе [114]. Формирование более крупных и сложно построенных олигомеров становится возможным при участии N- и, возможно, C-концевых участков малых белков теплового шока. О роли N-концевого домена в олигомеризации sHsp свидетельствуют многочисленные экспериментальные данные. Так, установлено, что удаление первых 25–56 аминокислотных остатков приводит к диссоциации крупных олигомеров  $\alpha$ A-кристаллина, Hsp27 китайского хомячка и Hsp16.2 из нематоды *Caenorhabditis elegans* до димеров или тетрамеров [19, 90, 97]. Hsp 12,6 из нематоды *Caenorhabditis elegans*, имеющий очень короткий N-концевой домен, состоящий всего из 25 аминокислотных остатков, не способен образовывать крупные мультимерные комплексы [96]. По всей видимости, в образовании крупных олигомеров участвуют WDPF мотивы, расположенные в N-концевой части sHsp (см. рис. 2). Такой вывод делается на основании того, что удаление участков, содержащих WDPF-домен препятствовало образованию крупных олигомеров, а удаление других (иногда даже очень протяженных) участков в N-концевой области не сказывалось на способности образовывать крупные олигомеры [59]. Установлено, что изолированные N-концевые домены (аминокислотные остатки 1–63)  $\alpha$ A-кристаллина взаимодействуют между собой [90] и образуют в растворе крупные агрегаты [114]. Гибридный белок,

состоящий из N-концевого домена (остатки 5–109) Hsp27 китайского хомячка и люциферазы, обладает способностью образовывать комплексы, состоящие из 5–6 мономеров [90]. Приведенные данные свидетельствуют о том, что в N-концевом домене sHsp есть «липкие» участки, способные взаимодействовать между собой и участвовать в формировании крупных олигомеров. Предполагают, что «липкие» N-концевые участки располагаются внутри сферы, образованной мономерами малых белков теплового шока, и могут, тем самым, способствовать как стабилизации крупных олигомерных комплексов, так и взаимодействию малых белков теплового шока с белками-субстратами sHsp [86, 97].

Роль C-концевого фрагмента в олигомеризации sHsp не вполне ясна. Эта часть молекулы малых белков теплового шока достаточно вариабельна по длине и аминокислотному составу, однако довольно часто содержит в своем составе фрагмент, гомологичный  $\beta$ 10-складке Hsp из *M. jannaschii* [86] и пшеницы [170], включающей последовательность (R/K)–X–(I/V)–X–(I/V) [97] (см. рис. 2Б). Установлено, что в случае малых белков теплового шока из *Methanococcus jannaschii* [86] и пшеницы [170]  $\beta$ 10-складка одного мономера взаимодействует с  $\beta$ 4 и  $\beta$ 8-складками другого мономера и за счет гидрофобных и ионных взаимодействий обеспечивает прочный контакт двух соседних субъединиц. В то же время отмечалось, что удаление 16 C-концевых аминокислотных остатков Hsp16,2 нематоды *C. elegans* [97] или 18 C-концевых остатков Hsp25 мыши [98] существенно не влияет на четвертичную структуру этих белков, хотя и сопровождается в последнем случае уменьшением устойчивости к нагреванию. Вероятно, C-концевая последовательность вносит определенный вклад в стабилизацию крупных олигомеров sHsp, хотя роль этого участка не столь заметна, как роль N-концевого участка этих белков. Высказывается предположение, что C-концевая последовательность может участвовать не только в формировании крупных олигомеров sHsp, но также важна для стабилизации комплексов, образованных малыми белками теплового шока и их белками-субстратами, находящимися в частично денатурированном состоянии [16, 152].

#### IV. СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА ОЛИГОМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Как уже отмечалось, мономеры малых белков теплового шока склонны к образованию устойчивых димеров, которые в свою очередь могут ассоциировать с образованием крупных олигомеров разной структуры и состава. Так например, Hsp16,5 из *M. jannaschii* образует

олигомеры, состоящие из 24 субъединиц (рис. 3В) [86]. Такая же стехиометрия характерна для Hsp16 из *S. vulcanus* [141]. В то же время Hsp16,3 из *Mycobacterium tuberculosis* образует олигомер, состоящий из 9 субъединиц, который представляет собой тример тримеров [28]. Следует отметить, что эта структура очень необычна и противоречит предположению о том, что все олигомеры sHsp собираются из димерных блоков.

Малые белки теплового шока растений, как правило, собираются в олигомерные комплексы из 12 субъединиц, организованных в два диска, содержащих по 6 мономеров (рис. 3Г). Такие комплексы характерны для Hsp18,1 и Hsp17,7 из цитозоля [93, 94] и Hsp21 из хлоропластов *Pisum sativum* [30].

Малые белки теплового шока млекопитающих (Hsp25/27 и кристаллины) формируют крупные олигомеры, состоящие из 16–32 (и более) субъединиц. По данным электронной микроскопии такие олигомеры представляют собой округлые частицы диаметром 13–25 нм с внутренней полостью диаметром около 8 нм [20, 40, 46]. Олигомеры sHsp млекопитающих в отличие от олигомеров бактериальных sHsp менее упорядочены и более динамичны. Например, крупные олигомерные комплексы Hsp25 мыши, состоящие из 16 мономеров, находятся в концентрационно-зависимом равновесии с тетрамерами и димерами [46]. Для Hsp25/27 человека [140] и курицы [125] и для  $\alpha$ A-кристаллина быка [17] установлена возможность обмена мономерами между крупными гомоолигомерами. На олигомерное состояние sHsp существенное влияние оказывает температура и фосфорилирование мономеров (см. ниже). Как правило, при повышении температуры крупные олигомеры малых белков теплового шока млекопитающих ассоциируют с образованием гранул с молекулярной массой 5000 кДа [44, 64]. В то же время, повышение температуры не влияет на олигомерное состояние Hsp16,5 из *M. jannaschii* [18] и даже может приводить к диссоциации олигомеров Hsp26 из *Saccharomyces cerevisiae* [60] и Hsp16,9 из пшеницы [170].

Учитывая динамичность олигомерных комплексов и сходство первичных структур различных малых белков теплового шока, можно было ожидать, что эти белки способны формировать не только гомоолигомерные, но и гетероолигомерные комплексы. Недавно было показано, что мономеры в составе олигомеров бактериальных sHsp могут довольно легко обмениваться [18]. В бактерии *Bradyrhizobium japonicum* выявлено 10 различных типов sHsp, которые относятся к двум разным классам. Внутри каждого из классов возможно образование гетероолигомерных комплексов, содержащих субъединицы разного сорта. В то же время белки, относящиеся к различным клас-

сам (т.н. классу А и классу В) не способны образовывать гетероолигомерные комплексы [160]. Аналогичные закономерности были выявлены при исследовании sHsp человека. Как уже отмечалось в предыдущем разделе, малые белки теплового шока человека могут быть разделены на 2 класса (см. рис. 1). В первый класс входят кристаллины, Hsp25/27, Hsp20 и сравнительно недавно описанный Hsp22, а во второй класс — HspB2 и HspB3. В опытах *in vitro* и *in vivo* были обнаружены гетероолигомерные комплексы, содержащие в своем составе два или даже три разных белка, принадлежащих только к одному и тому же семейству sHsp. Показана возможность образования гетероолигомерных комплексов, состоящих из  $\alpha$ -кристаллинов и Hsp25/27 [19, 180]; Hsp20 и Hsp25/27 [79, 163]; или Hsp22 и Hsp25/27 [12]. Кроме того, возможно образование комплексов, содержащих  $\alpha$ -кристаллины, Hsp25/27 и Hsp20. HspB2 и HspB3 никогда не входят в состав описанных комплексов, но способны взаимодействовать между собой с образованием гетероолигомерных комплексов [166], которые в ряде случаев оказались более устойчивыми, чем гомоолигомерные комплексы. Так гетероолигомер, образованный  $\alpha$ A- и  $\alpha$ B-кристаллинами в стехиометрии 3:1, заметно более устойчив к повышению температуры, чем гомоолигомерные комплексы  $\alpha$ A- и  $\alpha$ B-кристаллинов [165].

Работы последних лет свидетельствуют о том, что скорость обмена субъединиц разных олигомерных комплексов увеличивается с повышением температуры. Новое равновесное распределение, в котором единицами обмена являются димеры или тетрамеры sHsp, достигается за сравнительно короткие промежутки времени [17–19, 154]. В случае малых белков теплового шока растений также показана возможность образования гетероолигомерных комплексов. Уже через 10 минут после смешивания Hsp16,9 пшеницы и Hsp18,1 гороха образуются комплексы смешанного типа, состоящие из 12 субъединиц [154].

Завершая этот раздел, можно заключить, что sHsp образуют очень динамичные олигомерные комплексы, стабильность которых может зависеть от температуры, состава и размера образовавшегося комплекса, а также от посттрансляционных модификаций мономеров. Рассмотрим влияние фосфорилирования на олигомерную структуру малых белков теплового шока.

## V. ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ МАЛЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА

Одним из первых ответов клетки на тепловой шок [69, 91], воздействие некоторых гормонов [143, 175], цитокинов [62, 112] и факторов роста [62] является фосфорилирование малых белков теплового шока. Оказалось, что разные протеинкиназы участвуют в фосфорилировании разных sHsp.

Находящиеся на поверхности клетки рецепторы могут через соответствующие G-белки активировать аденилатциклазу, что приводит к активации сАМР-зависимой протеинкиназы (протеинкиназа А, ПКА) (рис. 5, см. цветную вкладку на стр. 82). Другие рецепторы, обладающие гуанилатциклазной активностью или способные активировать растворимую гуанилатциклазу, могут способствовать повышению уровня сGMP в клетке и, таким образом, активировать сGMP-зависимую протеинкиназу (протеинкиназа G, ПКГ). Третья группа рецепторов через соответствующие G-белки управляет активностью фосфолипазы C и, тем самым, влияет на изменение уровня  $Ca^{2+}$  внутри клетки и активирует Ca-фосфолипид зависимую протеинкиназу C (протеинкиназа C, ПКС). Протеинкиназа C, а также различные внеклеточные воздействия влияют на активность малых G-белков (Ras, Rac, Cdc42), которые в свою очередь управляют активностью киназ киназ MAP-киназ (Raf, MEKK, MLK) (рис. 5). Эти протеинкиназы фосфорилируют и активируют киназы MAP-киназ (МКК1/2, МКК7, МКК4) [15, 55, 162, 175]. Киназы MAP-киназ относятся к так называемому типу смешанных протеинкиназ, которые способны фосфорилировать остатки треонина и тирозина в составе MAP-киназ. Фосфорилированные и, тем самым, активированные киназы MAP-киназ фосфорилируют собственно MAP-киназы – ERK (extracellular regulated kinase) или p42/p44 MAP-киназу, JNK (c-jun N-terminal kinase) и p38 MAP-киназу (p38MAPK). Наконец, p38 MAP-киназа может фосфорилировать и активировать так называемые MAPKAP 2/3 протеинкиназы, которые фосфорилируют различные белки–мишени внутри клетки [92, 162]. Система ферментов, начинающаяся от малых G-белков и заканчивающаяся MAP-киназами, получила обозначение MAP-киназного каскада (от mitogen activated protein kinase). Четвертая система, принимающая участие в фосфорилировании sHsp, включает в себя интегрины, тем или иным способом сопряженные с тирозиновыми киназами (FAK/cSrc), белком паксилином (p21) и активируемой им РАК-киназой, которая через ряд посредников может влиять на активность p38 MAP-киназы (рис. 5). Еще одна система ферментов, участвующих в фосфорилировании

sHsp может состоять из рецепторов, обладающих тирозин-киназной активностью (например, рецепторы инсулина, рецепторы эпидермального фактора роста и др.) или других рецепторов, связанных с ними тирозиновых протеинкиназ и фосфоинозитид-3-киназы (PI-3 киназы), обеспечивающей синтез фосфатидилинозитол-3,4,5-фосфата (PIP<sub>3</sub>) [178]. PIP<sub>3</sub> является субстратом фосфолипазы C, а также выступает в качестве своеобразного якоря, расположенного на мембране и способствующего закреплению на мембране большой группы протеинкиназ (протеинкиназы B, фосфоинозитид-зависимых протеинкиназ и др.) (рис. 5). Рассмотрим участие различных протеинкиназ в фосфорилировании малых белков теплового шока.

Наиболее подробно исследовано фосфорилирование Hsp25/27. Установлено, что Hsp25/27 может фосфорилироваться под действием MAPKAP 2/3, которые узнают последовательность HXRXXS, где H — гидрофобный аминокислотный остаток [57, 62, 92]. Как видно из рис. 5, MAPKAP 2/3 может активироваться под действием p38 MAPK,  $\delta$  изоформой ПК C [62, 106]. Ранее предполагали, что MAPKAP 2/3 может активироваться под действием p42/p44 MAP-киназы [8, 66, 182], однако позднее было показано, что только p38 MAPK участвует в активации MAPKAP 2/3 [6, 57, 70]. MAPKAP 2/3 способна фосфорилировать два или три участка в структуре Hsp25/27. Как правило, один участок располагается вблизи WDPF-домена в N-концевой части, а два других участка — на самом N-конце кристаллинового домена (см. рис. 2). В случае Hsp27 человека MAPKAP 2/3 фосфорилирует Ser15, Ser78 и Ser82 [91], при этом в условиях *in vitro* наибольшее количество фосфата переносится на Ser82 [140]. Фосфорилирование Hsp25/27 под действием MAPKAP 2/3 не приводит к значительным изменениям во вторичной или третичной структуре sHsp или к изменению его температурной стабильности [140], но сопровождается диссоциацией крупных олигомеров Hsp25/27 и является одним из способов регуляции их олигомерного состояния. Этот вывод подтвержден в опытах на изолированных клетках, в ходе которых обработка форболовыми эфирами, интерлейкином 1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , омега-3-жирными кислотами, арсенатом и CdCl<sub>2</sub> сопровождалась фосфорилированием Hsp27 и уменьшением молекулярной массы олигомеров в 7–8 раз [80]. Аналогичные результаты были получены в опытах, в которых остатки серина в потенциальных участках фосфорилирования Hsp25/27 были заменены на остатки аспарагиновой или глутаминовой кислот [90, 125, 140]. Следует отметить, что ни фосфорилирование, ни мутации, имитирующие фосфорилирование, не приводили к диссоциации олигомеров Hsp25/27 до изолированных мономеров [90, 140].



Помимо МАРКАР 2/3 киназы Hsp25/27 может фосфорилироваться под действием сGMP-зависимой протеинкиназы, которая переносит остаток фосфата на Thr143 [26]. Фосфорилирование под действием ПКГ не зависит от предшествующего фосфорилирования под действием МАРКАР 2/3 киназы. Участие сGMP-зависимой протеинкиназы в регуляции олигомерного состояния Hsp25/27 остается неизученным. ПКА, Са-кальмодулин-зависимая протеинкиназа II, протеинкиназа S6 II, а также МАРКАР киназа 1, по-видимому, не принимают непосредственного участия в фосфорилировании Hsp27 [11, 22, 159, 181]. В опытах, проведенных на клетках, активаторы и ингибиторы ПКС через каскад МАР-киназ стимулируют или подавляют фосфорилирование р38 МАРК, что в конечном итоге влияет на фосфорилирование Hsp27 [15, 70]. Таким образом, Hsp25/27 является субстратом для протеинкиназ МАР-киназного каскада, а также для ПКГ, при этом фосфорилирование под действием МАРКАР 2/3 может участвовать в регуляции олигомерного состояния Hsp25/27.

Другой представитель малых белков теплового шока,  $\alpha$ -кристаллин, также подвергается фосфорилированию. В литературе есть данные о том, что  $\alpha$ -кристаллин обладает эндогенной протеинкиназной активностью, которая заметно возрастает при диссоциации олигомеров этого белка, вызванной добавлением дезоксихолата [75, 76]. К сожалению, эти интересные результаты не проверялись в более поздних исследованиях. Установлено, что  $\alpha$ В-кристаллин может подвергаться фосфорилированию по остаткам Ser45 и Ser59 под действием ERK (p42/p44) и МАРКАР 2, соответственно [81]. Ser19 также может подвергаться фосфорилированию, хотя до сих пор не установлено, какая из перечисленных протеинкиназ фосфорилирует этот участок. Фосфорилирование под действием МАР-киназ сопровождается диссоциацией олигомеров  $\alpha$ В-кристаллина и уменьшением их молекулярной массы от 500 до 300 кДа. Кроме того, мутации, имитирующие фосфорилирование, также приводили к диссоциации крупных олигомеров  $\alpha$ В-кристаллина [68]. В литературе есть сведения о том, что  $\alpha$ В-кристаллин может подвергаться фосфорилированию под действием ПКА [69, 155]. Таким образом,  $\alpha$ В-кристаллин может фосфорилироваться под действием сАМР-зависимой протеинкиназы и МАР-киназ, при этом, так же как в случае Hsp25/27, фосфорилирование под действием МАР-киназ сопровождается диссоциацией крупных олигомеров кристаллина.

В последнее время начато исследование фосфорилирования Hsp22. Оказалось, что так же, как в случае  $\alpha$ В-кристаллина, этот малый белок теплового шока обладает эндогенной протеинкиназной активностью [150]. Это, по-видимому, обусловлено наличием несколько



необычного и не совсем полного набора консенсусных мотивов, встречающихся в активном центре протеинкиназ. В последнее время появились данные о том, что в условиях *in vitro* Hsp22 может подвергаться фосфорилированию под действием ПКС и p44/p42 MAP-киназ [12]. Пока не известно какие ферменты фосфорилируют Hsp22 *in vivo* и как это сказывается на свойствах этого белка.

Малый белок теплового шока с молекулярной массой 20 кДа (Hsp20) также подвергается фосфорилированию. В условиях *in vitro* ПКА фосфорилирует Ser16 и Ser59 в структуре Hsp20. В аналогичных условиях протеинкиназа G фосфорилирует только Ser16 [7]. Стимуляция клеток фибробластами сопровождается фосфорилированием Ser134, а активация рецепторов инсулина приводит к фосфорилированию Ser157 в структуре Hsp20 крысы [176]. В настоящее время принято считать, что именно Ser16, фосфорилируемый ПКА или PKG и Ser157, фосфорилируемый протеинкиназами, активируемыми фосфоинозитид-3 киназой (рис. 5), являются основными участками фосфорилирования Hsp20. По всей видимости, фосфорилирование по каждому из этих участков предотвращает фосфорилирование по второму участку [176]. Установлено, что активация аденилатциклазы, приводящая к повышению активности ПКА и фосфорилированию Hsp20, сопровождается уменьшением размеров олигомерных комплексов, образованных этим малым белком теплового шока [22, 23]. Таким образом, фосфорилирование Hsp20 приводит к таким же последствиям, как и фосфорилирование Hsp25/27 или фосфорилирование кристаллинов. Во всех этих случаях фосфорилирование приводит к уменьшению размеров олигомерных комплексов, образованных sHsp. Данные литературы свидетельствуют о том, что имеется определенная корреляция между фосфорилированием Hsp20 и сократительной активностью гладких мышц. Установлено, что фосфорилирование Ser16 Hsp20 сопровождается расслаблением гладких мышц [7, 22, 23, 138], а фосфорилирование Ser157 этого белка может каким-то образом участвовать в активации сокращения скелетных мышц [176]. Детали этого процесса остаются не вполне понятными, но высказывается предположение, что Hsp20 способен связываться с актином и регулировать взаимодействие актина с миозином [23].

В условиях *in vivo* степень фосфорилирования sHsp может довольно быстро изменяться [181]. Это обусловлено тем, что есть как минимум две протеинфосфатазы, способные достаточно эффективно дефосфорилировать малые белки теплового шока. В опытах *in vitro* показано, что Са-кальмодулин-зависимая протеинфосфатаза 2В типа (кальцийнейрин) способна дефосфорилировать рекомбинантный

фосфорилированный Hsp25 [49]. Имеются также данные о том, что в условиях *in vivo* протеинфосфатаза 2А типа также способна дефосфорилировать Hsp27 [27].

Заканчивая этот раздел, можно заключить, что практически все sHsp могут фосфорилироваться под действием различных протеинкиназ, которые, в свою очередь, могут регулироваться циклическими нуклеотидами, ионами кальция и фосфолипидами, могут входить в состав MAP-киназного каскада, а также могут регулироваться тирозиновыми киназами или зависеть от фосфоинозитид-3 киназы (рис. 5). Фосфорилирование, как правило, приводит к диссоциации крупных олигомеров sHsp [22, 23, 68, 140], может способствовать формированию гетероолигомеров этих белков [12] и тем самым влиять на их шаперонную активность. Обратимся теперь к анализу шаперонной активности малых белков теплового шока.

## VI. ШАПЕРОННАЯ АКТИВНОСТЬ

Тепловой шок сопровождается повышением экспрессии некоторых sHsp и увеличивает резистентность клеток к повреждающим факторам. Считается, что малые белки теплового шока выполняют функции молекулярных шаперонов и предотвращают агрегацию частично денатурированных белков в клетке. Действительно, в ряде работ было показано, что в условиях *in vitro* sHsp способны предотвращать термоагрегацию цитратсинтазы [25, 59, 73, 87, 93, 94, 115, 137], адьфа-глюкозидазы [45, 73, 115], малатдегидрогеназы [94], алкогольдегидрогеназы [20, 32, 137, 146], глицеральдегидфосфатдегидрогеназы [94], лактатдегидрогеназы [93], люциферазы [94],  $\gamma$ -кристаллина [37, 131, 136],  $\beta$ -кристаллина [32, 136], а также агрегацию  $\alpha$ -лактальбумина [20, 98–100, 134, 137] и инсулина [20, 60, 131, 137, 152], вызываемую восстановлением их дисульфидных связей.

sHsp узнают и избирательно взаимодействуют с белками, находящимися в частично денатурированном, не идеально упакованном состоянии (рис. 6, см. цветную вкладку на стр. 83). Рассмотрим взаимодействие малых белков теплового шока с белками-субстратами на примере  $\alpha$ -лактальбумина.  $\alpha$ -Лактальбумин может пребывать в нескольких различных конформационных состояниях, отличающихся по степени упаковки. Нативный лактальбумин содержит ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и имеет стабильную компактную структуру. Лактальбумин, лишенный ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (апо-форма), находится в состоянии стабильной расплавленной глобулы, когда сохраняется вторичная структура белка, а третичная структура, хотя и довольно расшатанная, все еще способна поддерживать устойчивую конформацию белка. Апо-лактальбумин

с восстановленными дисульфидными связями переходит в состояние неупорядоченной расплавленной глобулы, когда третичная структура белка сильно ослаблена, а белок склонен агрегировать с образованием нерастворимого осадка [99, 134]. Оказалось, что sHsp взаимодействуют преимущественно с белками-субстратами, находящимися в состоянии неупорядоченной расплавленной глобулы, т.е. с такими структурами, которые имеют тенденцию к агрегации и образованию нерастворимых осадков. Малые белки теплового шока не взаимодействуют (или слабо взаимодействуют) с другими более термодинамически устойчивыми формами частично денатурированного белка [37, 99, 100, 134].

Как уже отмечалось, изолированные sHsp образуют крупные олигомеры. Такие олигомеры взаимодействуют с частично денатурированными белками с образованием еще больших по размеру комплексов, которые тем не менее остаются в растворимом состоянии. Так например, олигомер Hsp26 из дрожжей представляет собой сферу диаметром 15 нм. При взаимодействии этого белка с частично денатурированной цитратсинтазой образуются крупные сферические комплексы диаметром около 23 нм [60]. Аналогичные закономерности были выявлены при исследовании структуры комплексов, образованных Hsp 18,1 из гороха с малатдегидрогеназой [94], и Hsp25 мышцы с цитратсинтазой [44]. Комплексы sHsp с белками-субстратами очень стабильны и не разрушаются даже при длительной инкубации при комнатной температуре или при добавлении 1 М NaCl [60, 94].

Считается, что sHsp взаимодействуют со своими белками-субстратами в основном за счет гидрофобных контактов [38, 135, 147, 151]. Именно поэтому особое внимание уделялось исследованию гидрофобных участков в структуре олигомеров sHsp. Используя гидрофобные зонды, удалось показать, что повышение температуры, как правило, сопровождается структурными перестройками в олигомере малых белков теплового шока и экспонированием гидрофобных участков [38, 135, 137, 153]. Вероятно, именно поэтому sHsp преимущественно взаимодействуют с частично денатурированными белками, имеющими обнаженные гидрофобные участки, и не взаимодействуют (или слабо взаимодействуют) с белками, имеющими нативную структуру [153].

Множество публикаций посвящено картированию участков sHsp, ответственных за связывание белков-субстратов. Нам кажется, что подобные исследования не вполне оправданы. Малые белки теплового шока не обладают узкой специфичностью и взаимодействуют с различными частично денатурированными белками. В этой связи

вполне возможно, что участки связывания одних белков-субстратов будут отличаться от участков связывания других белков-субстратов и поэтому невозможно точно охарактеризовать потенциальные участки связывания. Как уже отмечалось, олигомеры sHsp часто имеют форму полого шара. Высказывается предположение, что повышенная гидрофобность внутренней полости такого шара может приводить к тому, что денатурированные белки связываются внутри сферы [86]. В то же время нельзя исключить возможности того, что денатурированные белки сорбируются на поверхности таких шарообразных структур, при этом сорбция белков-субстратов приводит к слиянию нескольких олигомеров с образованием огромных комплексов, размер которых достигает 40 нм [94].

Опыты, направленные на более точное картирование участков связывания субстрата, привели к заключению, что этот участок может находиться в третьей и четвертой  $\beta$ -складках кристаллинового домена sHsp и может перекрываться с SCM-1 мотивом (см. рис. 2–4) [47, 63, 86, 94, 146, 147, 149]. Этот вывод согласуется с тем фактом, что спонтанное гликирование определенных остатков лизина, расположенных в третьей и четвертой  $\beta$ -складках кристаллинов [31, 63, 123] сопровождается уменьшением шаперонной активности [148].

Несмотря на то, что представленные данные свидетельствуют о том, что субстрат-связывающий участок располагается в  $\alpha$ -кристаллиновом домене, изолированные  $\alpha$ -кристаллиновые домены менее эффективны в подавлении агрегации денатурированных белков по сравнению с нативными sHsp [48]. По всей видимости, только сравнительно крупные олигомеры sHsp обладают достаточно высокой шаперонной активностью. Как уже отмечалось, N-концевой участок малых белков теплового шока играет важную роль в формировании олигомерных комплексов. Оказалось, что делеции в WDPF-мотиве N-концевого домена сопровождаются как потерей способности образовывать крупные олигомеры, так и потерей шаперонной активности  $\alpha$ B-кристаллина [131]. Высказывается предположение, что образование мультимеров, в формировании которых принимает участие N-концевой домен, необходимо для связывания субстратов и нормальной шаперонной активности sHsp [96, 97, 153].

C-концевой участок, по всей видимости, выполняет вспомогательную роль при формировании олигомеров малых белков теплового шока. Оказалось, что Hsp25 мыши с делецией 18 C-концевых аминокислотных остатков не способен подавлять агрегацию лактальбумина, хотя и сохраняет шаперонную активность по отношению к цитратсинтазе [98]. Скорее всего C-концевая последовательность sHsp напрямую не участвует в связывании субстратов, но может

влиять на растворимость комплекса sHsp с субстратами [16, 152]. Делеция этого участка или мутации, увеличивающие его гидрофобность, снижают температурную стабильность sHsp и ухудшают растворимость комплексов sHsp с некоторыми белками-субстратами. Следствием этого является уменьшение шаперонной активности sHsp [85, 152].

Суммируя этот раздел, можно заключить, что олигомеры sHsp обладают высокой шаперонной активностью. В ряде случаев диссоциация крупных олигомеров sHsp, вызванная фосфорилированием, сопровождается заметным уменьшением шаперонной активности, а агрегация олигомеров с образованием очень крупных гранул не приводит к уменьшению шаперонной активности [46, 140]. Эта закономерность не является универсальной и не выполняется при взаимодействии некоторых субстратов с Hsp26 из дрожжей и Hsp16,9 из пшеницы. В этом случае повышение температуры сопровождается диссоциацией олигомеров sHsp и увеличением их шаперонной активности [60, 170]. Возможно, в этом случае диссоциация крупных олигомеров приводит к демаскированию ранее спрятанных гидрофобных участков sHsp, что и является причиной увеличения шаперонной активности.

Связывая частично денатурированные белки-субстраты, sHsp препятствуют их агрегации, но не способны восстановить их ферментативную активность [25, 44, 73, 94, 171]. Например, при 45°C Hsp25 мыши образует прочный комплекс с цитратсинтазой и предотвращает ее агрегацию, но после понижения температуры до 25°C не наблюдается восстановления ферментативной активности цитратсинтазы [44]. Если же в дополнение к малому белку теплового шока в среду инкубации добавляли Hsp70 и АТФ, то наблюдалась эффективная реактивация фермента [44]. Было высказано предположение, что sHsp играют роль своеобразного резервуара для белков, находящихся в состоянии расплавленной глобулы. Будучи в комплексе с белком теплового шока, белки-субстраты не агрегируют и остаются в такой конформации, которая делает возможным их реактивацию под действием Hsp70 и АТФ. Это предположение было подтверждено Вайнгером с соавт. [171], которые исследовали влияние АТФ-зависимых шаперонов DnaK/DnaJ/GrpE (бактериальный Hsp70 с его ко-шаперонинами) и GroEL/GroES (бактериальный Hsp60 и его ко-шаперонинами) на реактивацию малатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы в присутствии малого белка теплового шока IbpB из *E. coli*. Как и в ранее описанном случае, изолированный IbpB оказался не способным обеспечить реактивацию исследуемых ферментов, но добавление АТФ-зависимых шаперонов и АТФ обеспечивало эффек-

тивную реактивацию. Авторы предложили схему рефолдинга денатурированных белков с участием нескольких шаперонов (рис. 7, см. цветную вкладку на стр. 83). Подвергаясь денатурации, белок переходит в состояние нестабильной расплавленной глобулы (РГ). При этом частично денатурированный белок может либо агрегировать (стрелка 1), либо самостоятельно свернуться и восстановить исходную интактную конформацию (стрелка 2), либо принять интактную структуру с помощью различных шаперонов (стрелки 3–8). Термоденатурированная малатдегидрогеназа оказалась способной связываться со всеми тремя шаперонами (малым белком теплового шока IbpB, DnaK/DnaJ/GrpE и GroEL–GroES) (стрелки 3–5), однако для наиболее эффективной реактивации малатдегидрогеназы требовался последовательный переход денатурированного фермента от IbpB к DnaK/DnaJ/GrpE, а затем к GroEL/GroES. Таким образом, при ренатурации малатдегидрогеназа перемещалась по пути, отмеченному стрелками 3, 6, 7, 10 на рис. 7. Для реактивации лактатдегидрогеназы было достаточно присутствия IbpB, DnaK/DnaJ/GrpE и АТФ. Таким образом, в этом случае ренатурация лактатдегидрогеназы проходила по пути, отмеченному стрелками 3, 6, 9. Люцифераза из светлячков, денатурированная в присутствии гуанидин хлорида, сначала связывается с GroEL/GroES, а затем переходит на DnaK/DnaJ/GrpE, то есть перемещается по пути, отмеченному стрелками 5, 8 и 9. Таким образом, для разных белков клетка использует разные пути рефолдинга, и только наличие сложной системы шаперонов позволяет клетке оперативно и успешно справляться с различными последствиями стрессорных воздействий [121].

Долгое время считалось, что активность sHsp не зависит от АТФ [126], однако в последние годы появились данные о том, что АТФ каким-то образом влияет на их функционирование [105]. Установлено, что АТФ вызывает изменения спектра триптофановой флуоресценции [118, 174], повышает устойчивость к протеолизу [119], и каким-то образом влияет на связывание гидрофобного флуоресцентного зонда бис-ANS с  $\alpha$ -кристаллином [153]. Любопытно, что АТФ активировал шаперонную активность  $\alpha$ B-кристаллина по отношению к цитратсинтазе и ингибировал шаперонную активность Hsp18,1 по отношению к цитратсинтазе и малатдегидрогеназе [95, 118, 153]. Помимо этого, АТФ в миллимолярных концентрациях вызывал диссоциацию комплексов  $\alpha$ -кристаллина с частично денатурированной цитратсинтазой, однако при этом не происходило гидролиза АТФ [174]. В настоящее время трудно дать однозначное объяснение возможного участия АТФ в функционировании sHsp. Видимо, нельзя полностью исключить и вероятность того, что АТФ влияет не только



на функционирование малых белков теплового шока, но и на структуру белков-субстратов. В литературе высказывается предположение о том, что при некоторых видах стресса в клетках происходит значительное понижение уровня АТФ [144], что приводит к более прочному связыванию частично денатурированных белков-субстратов с малыми белками теплового шока. По мере того, как клетка возвращается в нормальное состояние, концентрация АТФ возвращается к исходному уровню. Это способствует диссоциации денатурированных белков от олигомеров sHsp и их ренатурации под действием АТФ-зависимых белков теплового шока [95, 174].

Как следует из представленных данных, sHsp участвуют во многих процессах, происходящих в клетке. Попытаемся проанализировать их роль в развитии некоторых заболеваний, а также в процессах, управляющих программируемой гибелью клетки.

## **VII. УЧАСТИЕ МАЛЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА В ПОДДЕРЖАНИИ НОРМАЛЬНОЙ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ И ПРОГРАММИРУЕМОЙ ГИБЕЛИ КЛЕТОК**

Как уже отмечалось, sHsp эффективно препятствуют агрегации частично денатурированных белков *in vitro* [73, 94, 98, 99, 116]. К сожалению, до сих пор нет прямых данных о том, насколько эта способность малых белков теплового шока существенна для выполнения их функций в живой клетке. Известно, что накопление белковых агрегатов, являющееся результатом их неправильного сворачивания, сопровождается рядом заболеваний, таких как образование катаракты, цирроз печени, некоторые виды миопатий, губчатые энцефалопатии (болезнь Куру, болезнь Крейтцфельда-Якоба), нейродегенеративные болезни и др. Зачастую агрегаты неправильно свернутых белков образуют  $\beta$ -амилоидные структуры, которые очень устойчивы к протеолизу и не могут быть удалены из клетки. Агрегаты белков, накапливающиеся внутри клетки или в межклеточном пространстве, каким-то не вполне понятным образом оказывают повреждающее влияние и приводят к гибели клеток. Достаточно подробно исследован процесс формирования катаракты. При этом заболевании происходит агрегация кристаллинов в хрусталике глаза, что приводит к его помутнению и в конечном итоге к потере зрения [9]. Интактный  $\alpha$ A-кристаллин эффективно препятствует агрегации  $\beta$  и  $\gamma$ -кристаллинов и тем самым предотвращает образование катаракты. Оказалось, что мутация R116C гена  $\alpha$ A-кристаллина является причиной наследственной катаракты [103]. Это обусловлено тем, что мутант-



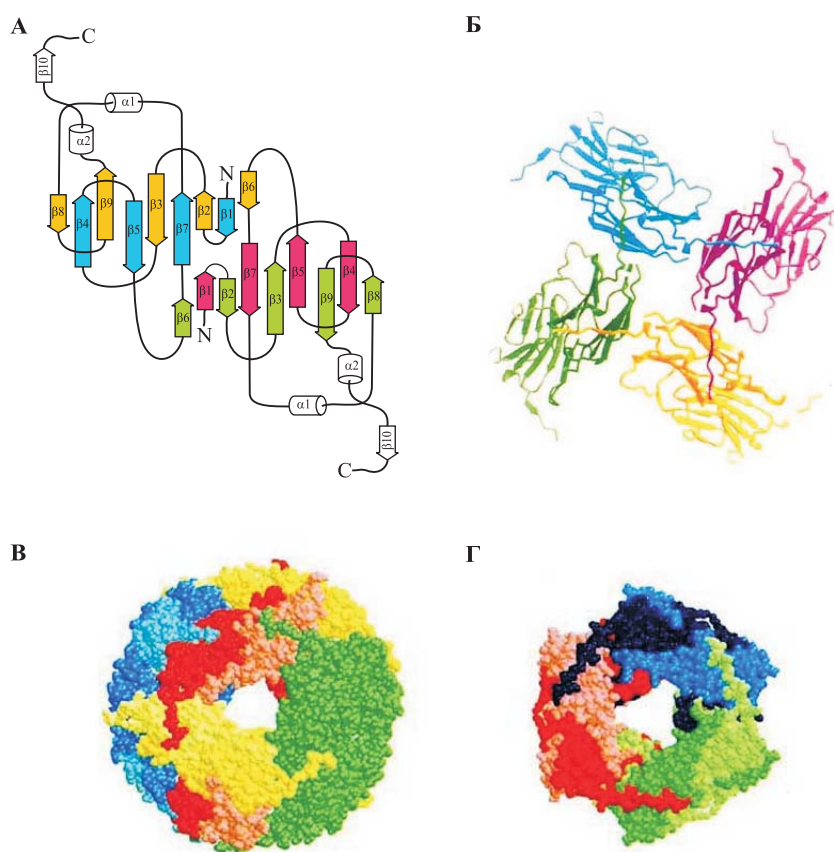


Рис. 3. Структура олигомеров малых белков теплового шока на примере Hsp16,5 из *M. jannaschii* [86] и Hsp16,9 из пшеницы [170].

А. Вторичная структура димера Hsp16,5.  $\beta$ -складки, вовлеченные в образование четырех  $\beta$ -слоев, обозначены четырьмя разными цветами. В желтый и зеленый  $\beta$ -слои входят складки, принадлежащие как верхнему, так и нижнему мономерам.

Б. Взаимодействие четырех димеров Hsp16,5 *Methanococcus jannaschii*. Каждый из димеров обозначен своим цветом.

В. Олигомерная структура Hsp16,5 *M. jannaschii*. Каждый тетрамер обозначен разным цветом.

Г. Олигомерная структура Hsp16,9 из пшеницы. Каждый димер обозначен разным цветом.

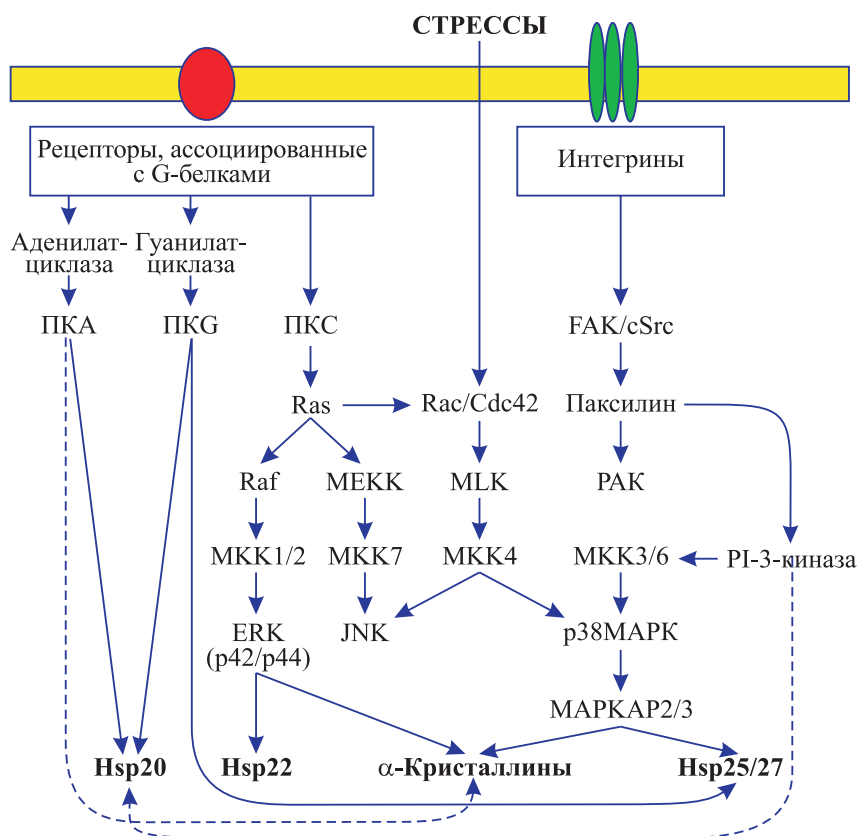


Рис. 5. Схема участия различных протеинкиназ в фосфорилировании малых белков теплового шока (по [55, 162] с изменениями и модификациями).

PKA, сАМР-зависимая протеинкиназа; PKG, сGMP-зависимая протеинкиназа; ПКС, Са-фосфолипид-зависимая протеинкиназа. Ras, Rac и Cdc42 — малые G-белки. МККК, киназы киназ MAPK, состоят из MEKK (киназа киназ MAPK и ERK), киназ смешанной специфичности (MLK, mixed lineage kinase), и киназ, активируемых белком 21 (PAK). Эти ферменты могут фосфорилировать и регулировать активность нескольких митоген-активируемых киназ, обозначенных МКК 1/2, 3/6, 4 и 7. Эти ферменты фосфорилируют три разных MAP-киназы — киназу, чувствительную к внешним воздействиям (ERK, extracellular responsive kinase); киназу, фосфорилирующую N-конец фактора c-Jun, (JNK); и MAP-киназу с молекулярной массой 38 кДа (p38 MAPK). p38 MAPK фосфорилирует и активирует MAPKAP-2 киназу, фосфорилирующую hsp25/27. FAK/cSrc — комплекс двух цитоплазматических тирозинкиназ: киназы фокальных контактов (focal adhesion kinase) с молекулярной массой 120 кДа и киназы cSrc с молекулярной массой 60 кДа. PI-3 киназа, фосфоинозитид-3 киназа, синтезирует фосфатидил-инозитол-3,4,5-фосфаты, и тем самым активирует фосфоинозитид-зависимые протеинкиназы, также способные фосфорилировать малые белки теплового шока (hsp20).

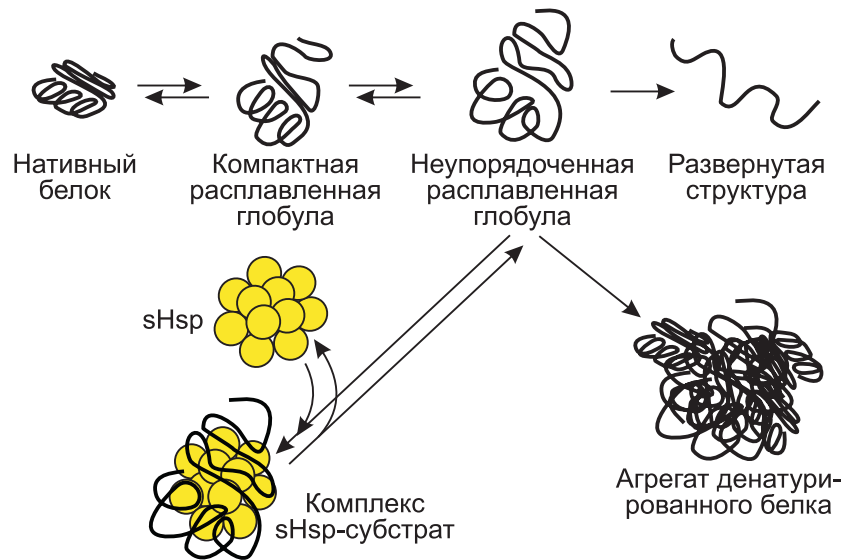


Рис. 6. Предполагаемый механизм взаимодействия малых белков теплового шока с частично денатурированными белками (по [100]).

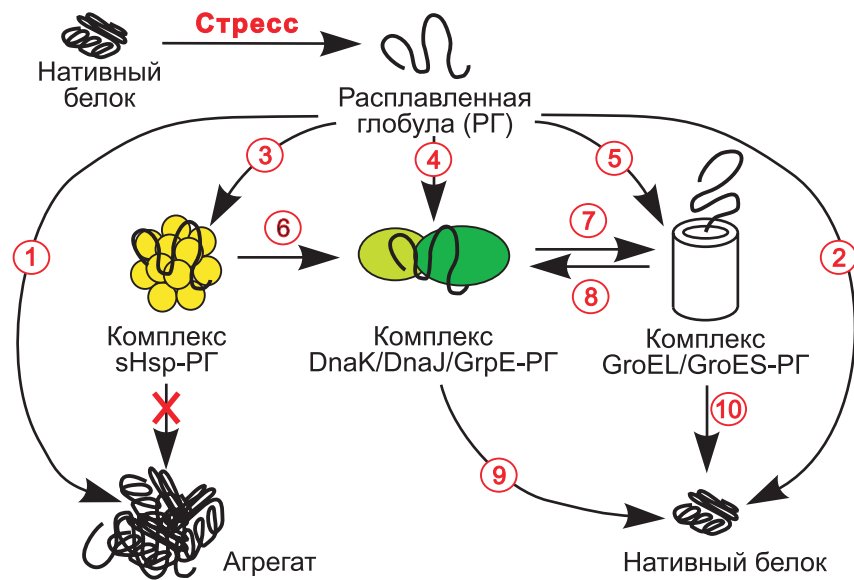


Рис. 7. Схема возможного участия разных белков теплового шока в рефолдинге и ренатурации частично денатурированных белков (по [171]). Подробности – в тексте.

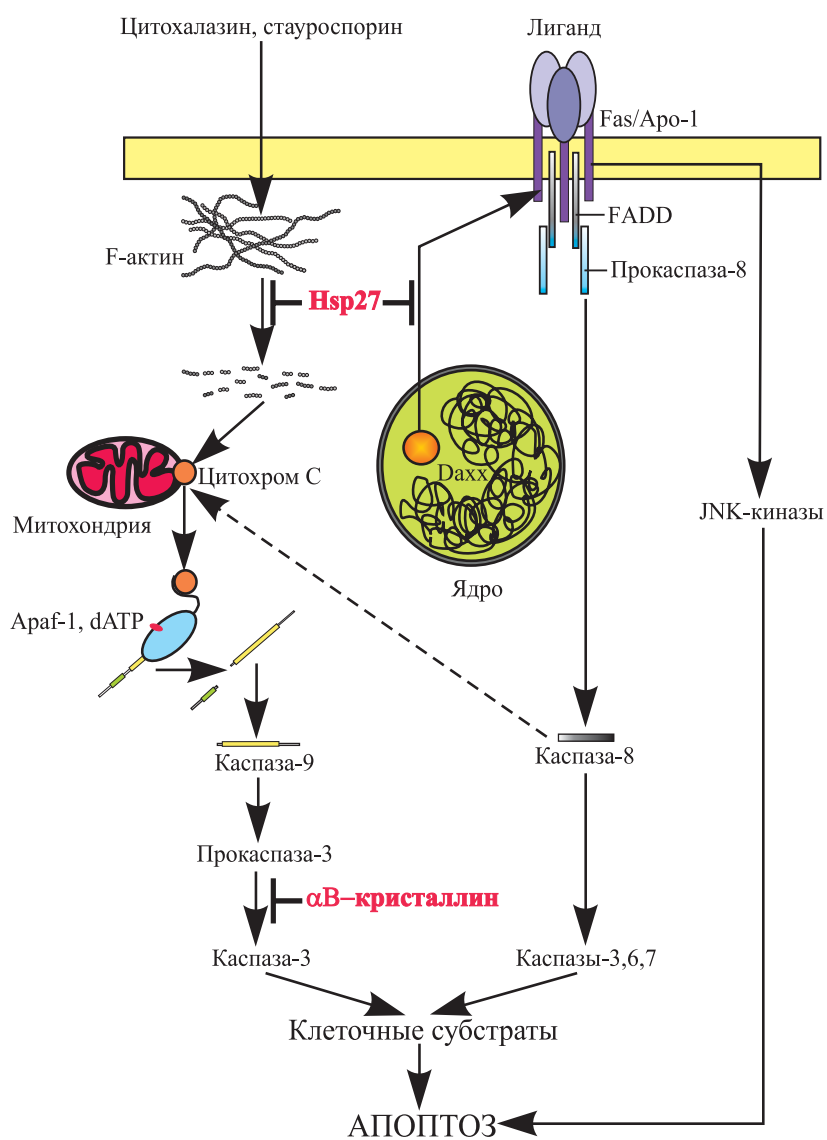


Рис. 8. Схема возможного участия малых белков теплового шока в процессах апоптоза. Подробности – в тексте.

ный  $\alpha$ A-кристаллин не способен предотвращать агрегацию  $\beta$ - и  $\gamma$ -кристаллинов, составляющих около 65% от всех белков хрусталика, следствием чего является раннее развитие катаракты.

Сходные закономерности были выявлены и при исследовании другого наследственного заболевания — миопатии, обусловленной неправильным формированием десминовых филаментов. При этом заболевании точечная мутация R120G в гене  $\alpha$ B-кристаллина приводит к изменению вторичной, третичной и четвертичной структуры белка, к снижению его шаперонной активности и изменению чувствительности к протеолизу [20, 130]. Вследствие этого изменяется взаимодействие  $\alpha$ B-кристаллина с десмином, основным компонентом промежуточных филаментов. Мутантный адфаB-кристаллин прочнее взаимодействует с промежуточными филаментами, сформированными десмином, и способствует слипанию филаментов, формирующих практически нерастворимый гель [130, 172].

Накопление белковых агрегатов в клетках наблюдается также при некоторых нейродегенеративных заболеваниях. Для болезни Александра характерно образование так называемых фибрилл Розенталя — особых тел включения, накапливающихся в астроцитах. При этом тяжесть заболевания зависит от накопления телец включения. Фибриллы Розенталя состоят из белка промежуточных филаментов GFAP (glial fibrillary acidic protein) и захватывают из цитоплазмы  $\alpha$ B-кристаллин, Hsp27 и убиквитин [56, 71, 72]. Установлено, что тела включения, сходные с фибриллами Розенталя, могут быть получены искусственно в клетках культуры астроцитомы путем увеличения экспрессии GFAP. Ответной реакцией клетки на накопление агрегированного GFAP является увеличение синтеза Hsp27 или  $\alpha$ B-кристаллина. Повышенная экспрессия белков теплового шока вызывает уменьшение количества и размеров гранул агрегированных белков [61].

Представленные данные свидетельствуют о том, что sHsp ( $\alpha$ B-кристаллин и Hsp27) взаимодействуют с белками промежуточных филаментов и могут влиять на их способность формировать трехмерные гелеобразные структуры. Действительно, болезнь Александра — не единственный случай, когда в клетках образуются тела включения, состоящие из белков промежуточных филаментов и малых Hsp. При болезни Паркинсона в клетках обнаруживаются так называемые тела Леви, состоящие из sHsp и нейрофиламентов, а цирроз печени сопровождается накоплением телец Маллори, образованных кератиновыми филаментами и sHsp [104]. Детальное исследование взаимодействия sHsp с белками промежуточных филаментов может дать ключ к пониманию молекулярных механизмов развития вышеперечисленных заболеваний.

Повышенный синтез sHsp наблюдается не только в клетках, в которых происходит накопление нерастворимых белковых агрегатов, но и в клетках, подвергшихся воздействию различных неблагоприятных факторов. Например, по данным ряда авторов окислительный стресс сопровождается усиленным синтезом sHsp [110]. Большая часть исследователей склоняется к заключению, что sHsp защищают клетку от окислительного шока [65, 110], хотя в литературе высказывается и противоположная точка зрения [4]. Предполагают, что sHsp каким-то образом активируют или стабилизируют глюкозо-6-фосфат дегидрогеназу, фермент, продуктом которого является NADPH. Повышение уровня NADPH повышает активность глутатион-редуктазы, а это в свою очередь обеспечивает поддержание нормального уровня восстановленного глутатиона [133]. В опытах, проведенных с точечными мутантами Hsp27, было установлено, что защитный эффект против окислительного шока проявляют только формы Hsp27, способные образовывать крупные олигомерные комплексы. Мутации, имитирующие фосфорилирование и приводящие к диссоциации крупных олигомеров Hsp27, приводили к существенному уменьшению защитного эффекта от окислительного стресса [133].

В последнее время появились сведения о том, что олигомерное состояние sHsp, а, значит, и их защитное действие от окислительного шока, могут регулироваться не только путем фосфорилирования, но и путем химической модификации определенных аминокислотных остатков. Недавно было обнаружено, что Hsp27 может подвергаться химической модификации метилглиоксалем [142], являющимся побочным продуктом гликолиза и содержащимся в высоких концентрациях в некоторых раковых клетках и в клетках, больных сахарным диабетом [3, 124]. В ходе химической реакции метилглиоксаль модифицирует Arg-188 Hsp27 в аргпиримидин [142]. Такая модификация стабилизирует высокомолекулярные олигомерные комплексы Hsp27. Стабилизация осуществляется, по-видимому, за счет стэкинг-взаимодействий между ароматическими кольцами пиримидинов, принадлежащих соседним субъединицам Hsp27, входящим в состав олигомерного комплекса. Как уже отмечалось, именно крупные олигомеры Hsp27 наиболее активны в предотвращении гибели клетки при окислительном шоке [133]. Таким образом, модификация метилглиоксалем может обеспечивать дополнительный механизм регуляции олигомерного состояния Hsp27, независимый от процессов фосфорилирования.

В зависимости от концентрации образовавшихся активных форм кислорода окислительный стресс в конечном итоге ведет либо к

некрозу, либо к апоптозу. Высокий уровень активных форм кислорода вызывает сильное повреждение белков, липидов, нуклеиновых кислот, следствием чего является некроз. Умеренный окислительный стресс вызывает программируемую гибель клетки, т.е. приводит к апоптозу [132]. Результаты работы, выполненной на культуре эмбриональных фибробластов крысы, интерпретировались как свидетельство того, что Hsp27 препятствует некрозу, но не влияет на апоптоз [58]. По мнению авторов, защитный эффект был связан с вызванной Hsp27 стабилизацией актиновых филаментов. Однако, накапливается все больше данных о возможном участии sHsp в регуляции программированной клеточной смерти.

В некоторых злокачественных опухолях заметно повышен уровень экспрессии Hsp27 [35, 51], коррелирующий с ускоренным метастазированием и неблагоприятным исходом болезни [35, 41, 78, 139, 167]. Напротив, при обнаружении в крови онкологических больных антитела к Hsp27, выживаемость была выше [34]. Более того, в экспериментах на клеточных культурах было показано, что обработка клеток антителами, специфичными к Hsp27, могла приводить к апоптозу [168]. Эти данные позволяют думать, что малые белки теплового шока каким-то образом препятствуют развитию апоптоза.

Действительно, в литературе накоплено много фактов, свидетельствующих о том, что повышенная экспрессия Hsp27 сопровождается увеличением резистентности к препаратам, обладающим проапоптотным действием. Так, повышенная экспрессия экзогенного Hsp27 увеличивала устойчивость клеток к стауроспорину [128], этопозиду [50], TNF $\alpha$  [74, 112], циклогексимиду [74], доксорубину [53, 122, 139] и цисплатине [54, 139]. Кроме этого, Hsp27 защищал нейрональные клетки от апоптоза, индуцируемого удалением из среды фактора роста нервов [173]. Интересные данные были получены в работе на эмбриональных клетках мышцы. Повышенная экспрессия экзогенного Hsp27 человека или эндогенного Hsp25 инициировала дифференциацию клеток, тогда как снижение экспрессии sHsp предотвращало дифференцировку и вызывало апоптоз [111]. Аналогичные результаты были получены в работах с культурой обонятельных нейроblastов крысы [109]. Увеличение экспрессии Hsp27 наблюдалось при дифференцировке культуры клеток эмбриональной карциномы, индуцированной ретиноевой кислотой [158], и культуры промиелоцитов, индуцированной форболовыми эфирами [156]. Эти данные свидетельствуют о возможном участии sHsp в регуляции клеточной дифференциации и апоптоза.



Молекулярные механизмы антиапоптозной активности Hsp27 еще недостаточно изучены и, вероятно, могут различаться в зависимости от типа клеток. В настоящее время в литературе постулируется три основных пути влияния малых белков теплового шока на процессы апоптоза. Во-первых, sHsp могут влиять на функционирование и передачу сигнала от рецептора Fas/Apo-1 внутрь клетки, во-вторых, они могут тем или иным способом влиять на выход цитохрома с из митохондрий и, наконец, в-третьих, эти белки могут влиять на формирование апоптосом и активацию каскада каспаз (рис. 8, см. цветную вкладку на стр. 84). Рассмотрим каждый из этих путей в отдельности.

На культуре клеток мышинной фибросаркомы было показано, что Hsp27 блокирует апоптоз, вызываемый активацией рецептора Fas/Apo-1 [113]. После связывания с лигандом рецептор взаимодействует с адаптерными белками, одним из которых может быть белок FADD. Этот адаптерный белок связывает неактивную прокаспазу 8 и способствует ее активации при связывании рецептора с лигандом. Каспаза 8 активирует каспазы 3, 6 и 7 и тем самым инициирует протеолиз белков-мишеней, что в конечном итоге приводит к апоптозу (рис. 8). Кроме того, каспаза-8 может активировать белок Bid, вызывающий высвобождение цитохрома с из митохондрий. Место действия Hsp27 в этой сложной цепочке реакций пока точно не установлено.

Альтернативный путь запуска апоптоза через Fas/Apo-1 включает белок Daхх. Механизм действия этого белка не достаточно изучен. В норме Daхх локализован в ядре, где он связан с определенными белками, но способен перемещаться в цитоплазму и играть роль адаптерного белка, ответственного за запуск каскада JNK-киназ путем активации Fas/Apo-1 [179]. Предполагают, что Hsp27 способен перемещаться в ядро, где он взаимодействует с Daхх, препятствуя его выходу в цитоплазму и активации рецептора [29]. В отличие от рецептора TNF $\alpha$ , участвующего в запуске некроза опухолевых клеток, Fas/Apo-1 играет ключевую роль в процессе селекции лимфоцитов [145]. Интересно отметить, что специфическое накопление Hsp27 происходит при созревании В и Т-лимфоцитов [156]. Кроме этого Fas/Apo-1 активно экспрессируется при созревании репродуктивных тканей [161], а также в гладкой и скелетной мускулатуре [145]. Как описано выше, Hsp27 присутствует в этих тканях в значительных количествах, что может свидетельствовать о важной роли Hsp27 в регуляции Fas/Apo-1 *in vivo*.

Ранее отмечалось, что sHsp могут участвовать в регуляции апоптоза не только на уровне рецептора Fas/Apo-1, но и на уровне определенных внутриклеточных белков-мишеней. Действительно, было показано, что Hsp27 предотвращает апоптоз, запускаемый через митохондрии [24, 50, 74, 142], при этом авторы предлагают разные механизмы действия малых белков теплового шока (рис. 8). Как известно, падение мембранного потенциала, вызываемое некоторыми химическими агентами, приводит к высвобождению цитохрома с из митохондрий. В цитоплазме цитохром с связывается с белком Araf-1, дезокси АТФ и прокаспазой-9, формируя так называемую апоптосому. Формирование апоптосомы сопровождается автокаталитической активацией прокаспазы-9 и ее переходом в активную форму каспазы-9. Этот фермент активирует прокаспазу-3 и следующие за ней каспазы, участвующие в процессе апоптоза [132]. В лейкемических клетках человека Hsp27 не предотвращает падение мембранного потенциала и не препятствует выходу цитохрома с из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль. Однако, в бесклеточной системе Hsp27 ингибирует автокаталитическое расщепление прокаспазы-9, индуцированное добавлением дезокси АТФ и цитохрома с [50]. Хотя авторам не удалось продемонстрировать взаимодействие Hsp27 ни с одним компонентом апоптосомы *in vitro*, они предполагают, что Hsp27 ингибирует апоптоз на этапе между высвобождением цитохрома с и расщеплением прокаспазы-9 в апоптосоме.

В последнее время в литературе появились данные о том, что Hsp27 способен взаимодействовать с цитохромом с [24, 74]. Вопрос о том, какая часть освободившегося из митохондрий цитохрома с связывается с Hsp27 остается открытым. В работе Пауля и соавт. [129] показано, что Hsp27 связывает лишь очень незначительную долю вышедшего из митохондрий цитохрома с и, поэтому, не может играть существенной роли в формировании апоптосомы. По данным этих авторов Hsp27 препятствует снижению мембранного потенциала, вызываемого белком Вах, но не взаимодействует с этим белком. Авторы предполагают, что при митохондриальном пути развития апоптоза Hsp27 действует на более ранних этапах этого сложного процесса и предотвращает нарушение структуры актиновых филаментов. Этот процесс является одним из первых звеньев в цепи событий. Однако, следует отметить, что Hsp27 способен препятствовать развитию апоптоза, вызванного этопозином, при котором не происходит значительных нарушений структуры актиновых филаментов.

Суммируя многочисленные и во многом противоречивые сведения о влиянии Hsp27 на процессы апоптоза, можно заключить, что

sHsp могут оказывать влияние на разные этапы этого многостадийного процесса. При этом механизм влияния может зависеть от типа клетки и от способа индукции апоптоза.

Представленные ранее данные в основном касались малого белка теплового шока с молекулярной массой 27 кДа. Учитывая значительную гомологию в структуре sHsp, можно было ожидать, что  $\alpha$ B-кристаллин также будет препятствовать развитию апоптоза. Действительно, оказалось, что  $\alpha$ B-кристаллин также способен участвовать в регуляции апоптоза, развивающегося как при стимуляции рецепторов смерти, так и протекающего по митохондриальному пути [74, 113]. Тем не менее, механизм действия  $\alpha$ B-кристаллина, по всей видимости, отличен от механизма действия Hsp27. Оказалось, что  $\alpha$ B-кристаллин взаимодействует с частично процессированной каспазой-3, препятствуя диссоциации продомена от большой функционально активной субъединицы [74, 107] (рис. 8). Высказывается предположение, что  $\alpha$ B-кристаллин может играть роль в нетипичном апоптозе, имеющем место при дифференцировке клеток хрусталика [74]. В ходе этого процесса будущая клетка хрусталика лишается ядра и других органелл, но не погибает из-за того, что происходит приостановка заключительных стадий апоптоза.

Перечисленные данные свидетельствуют о несомненной важности sHsp в регуляции нормальной жизнедеятельности клеток, а также в процессах апоптоза и злокачественного перерождения. В этой связи изучение структуры и механизма действия этих белков представляет несомненный интерес для практической медицины.

## VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Завершая обзор, можно заключить, что sHsp представляют собой большую и довольно гетерогенную группу белков, участвующих в предотвращении агрегации и защищающих клетку от накопления частично денатурированных белков. Малые белки теплового шока, как правило, являются сложно построенными олигомерами. Изменение температуры или посттрансляционные модификации могут сопровождаться изменением олигомерного состояния sHsp и приводить к изменению их шаперонной активности. Малые белки теплового шока способны связывать частично денатурированные белки и передавать их АТР-зависимым шаперонам, которые обеспечивают полную ренатурацию белков-субстратов. Благодаря своей сравнительно низкой специфичности sHsp могут взаимодействовать с различными внутриклеточными белками и регулировать многочис-

ленные процессы, протекающие как при нормальных, так и при патологических состояниях. В настоящее время исследования малых белков теплового шока бурно развиваются и поэтому не могут быть достаточно подробно описаны даже в большом обзоре. Заинтересованный читатель может найти дополнительные сведения в обзорных работах, опубликованных в последнее время. Эволюция и структура малых белков теплового шока описаны в обзорах Де Ионга и соавт. [39], Эрншпергер и соавт. [43] и Нарберхауза [120]. Участие малых белков теплового шока в регуляции функционирования цитоскелета подробно описано в следующих обзорных работах [2, 61, 105]. Биомедицинская роль малых белков теплового шока подробно описана в обзорах Кларка и Муховски [33] и Брофи [21]. Некоторые вопросы участия малых белков теплового шока в регуляции апоптоза освещены в обзорах Арриго [5] и Гарридо и соавт. [52].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Букач О.В., Сеут Неби А.С., Панасенко О.О., Ким М.В., Гусев Н.Б. (2002) *Воп. биол. мед. фармацевт. химии*, **1**, 50–57.
2. Гусев Н.Б., Богачева Н.В., Марстон С.Б. (2002) *Биохимия*, **67**, 613–623.
3. Ahmed, M.U., Brinkmann Frye, E., Degenhardt, T.P., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. (1997) *Biochem. J.*, **324**, 565–570.
4. Arata, S., Hamaguchi, S., Nose, K. (1995) *J. Cell Physiol.*, **163**, 458–465.
5. Arrigo, A.P. (2001) *IUBMB Life*, **52**, 303–307.
6. Azuma, N., Akasaka, N., Kito, H., Ikeda, M., Gahtan, V., Sasajima, T., Sumpio, B.E. (2001) *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)*, **280**, H189–97.
7. Beall, A.C., Kato, K., Goldenring, J.R., Rasmussen, H., Brophy, C.M. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 11283–11287.
8. Ben-Levy, R., Leighton, I.A., Doza, Y.N., Attwood, P., Morrice, N., Marshall, C.J., Cohen, P. (1995) *EMBO J.*, **14**, 5920–5930.
9. Benedek, G.B., Pande, J., Thurston, G.M., Clark, J.I. (1999) *Prog. Retin Eye Res.*, **18**, 391–402.
10. Benjamin, I.J., McMillan, D.R. (1998) *Circ. Res.*, **83**, 117–132.
11. Benndorf, R., Hayess, K., Stahl, J., Bielka, H. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1136**, 203–207.
12. Benndorf, R., Sun, X., Gilmont, R.R., Biederman, K.J., Molloy, M.P., Goodmurphy, C.W., Cheng, H., Andrews, P.C., Welsh, M.J. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 26753–26761.
13. Berengian, A.R., Bova, M.P., Mchaourab, H.S. (1997) *Biochemistry*, **36**, 9951–9957.
14. Berengian, A.R., Parfenova, M., Mchaourab, H.S. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 6305–6314.
15. Bitar, K.N., Ibitayo, A., Patil, S.B. (2002) *J. Appl. Physiol.*, **92**, 41–49.

16. Boelens, W.C., Croes, Y., de Ruwe, M., de Reu, L., de Jong, W.W. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 28085–28090.
17. Bova, M.P., Ding, L.L., Horwitz, J., Fung, B.K. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 29511–29517.
18. Bova, M.P., Huang, Q., Ding, L., Horwitz, J. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 38468–38475.
19. Bova, M.P., McHaourab, H.S., Han, Y., Fung, B.K. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 1035–1042.
20. Bova, M.P., Yaron, O., Huang, Q., Ding, L., Haley, D.A., Stewart, P.L., Horwitz, J. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6137–6142.
21. Brophy, C.M. (2000) *J. Vasc. Surg.*, **31**, 391–395.
22. Brophy, C.M., Dickinson, M., Woodrum, D. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 6324–6329.
23. Brophy, C.M., Lamb, S., Graham, A. (1999) *J. Vasc. Surg.*, **29**, 326–333.
24. Bruey, J.M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S.A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A.P., Kroemer, G., Solary, E., Garrido, C. (2000) *Nat. Cell Biol.*, **2**, 645–652.
25. Buchner, J., Grallert, H., Jakob, U. (1998) *Methods Enzymol.*, **290**, 323–338.
26. Butt, E., Immler, D., Meyer, H.E., Kotlyarov, A., Laass, K., Gaestel, M. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 7108–7113.
27. Cairns, J., Qin, S., Philp, R., Tan, Y.H., Guy, G.R. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 9176–9183.
28. Chang, Z., Primm, T.P., Jakana, J., Lee, I.H., Serysheva, I., Chiu, W., Gilbert, H.F., Quioco, F.A. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 7218–7223.
29. Charette, S.J., Lavoie, J.N., Lambert, H., Landry, J. (2000) *Mol. Cell Biol.*, **20**, 7602–7612.
30. Chen, Q., Osteryoung, K., Vierling, E. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 13216–13223.
31. Cherian, M., Abraham, E.C. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**, 675–679.
32. Clark, J.I., Huang, Q.L. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 15185–15189.
33. Clark, J.I., Muchowski, P.J. (2000) *Curr Opin. Struct. Biol.*, **10**, 52–59.
34. Conroy, S.E., Sasieni, P.D., Amin, V., Wang, D.Y., Smith, P., Fentiman, I.S., Latchman, D.S. (1998) *Br. J. Cancer*, **77**, 1875–1879.
35. Cornford, P.A., Dodson, A.R., Parsons, K.F., Desmond, A.D., Woolfenden, A., Fordham, M., Neoptolemos, J.P., Ke, Y., Foster, C.S. (2000) *Cancer Res.*, **60**, 7099–7105.
36. Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohaszka, Z., Nardai, G. (1998) *Pharmacol. Ther.*, **79**, 129–168.
37. Das, K.P., Petrash, J.M., Surewicz, W.K. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 10449–10452.
38. Das, K.P., Surewicz, W.K. (1995) *FEBS Lett.*, **369**, 321–325.
39. de Jong, W.W., Leunissen, J.A., Voorster, C.E. (1993) *Mol. Biol. Evol.*, **10**, 103–126.
40. Deretic, D., Aebersold, R.H., Morrison, H.D., Papermaster, D.S. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 16853–16861.
41. Devaja, O., King, R.J., Papadopoulos, A., Raju, K.S. (1997) *Eur. J. Gynaecol. Oncol.*, **18**, 16–22.
42. Ehrnsperger, M., Buchner, J. (2002) *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*, **5**, 2931–2934.
43. Ehrnsperger, M., Buchner, J., Gaestel, M. (1998) *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins. Structure, Function and Mode of Action.* / Ed.

- A.L. Fink, Y. Goto. New York, Basel, Hong-Kong.: Marcel Derrker Inc., 533–575.
44. *Ehrnsperger, M., Graber, S., Gaestel, M., and Buchner, J.* (1997) *EMBO J.*, **16**, 221–229.
45. *Ehrnsperger, M., Hergersberg, C., Wienhues, U., Nichtl, A., Buchner, J.* (1998) *Anal. Biochem.*, **259**, 218–225.
46. *Ehrnsperger, M., Lilie, H., Gaestel, M., Buchner, J.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 14867–14874.
47. *Farnsworth, P.N., Singh, K.* (2000) *FEBS Lett.*, **482**, 175–179.
48. *Feil, I.K., Malfois, M., Hendle, J., van Der Zandt, H., Svergun, D.I.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 12024–12029.
49. *Gaestel, M., Benndorf, R., Hayess, K., Priemer, E., Engel, K.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 21607–21611.
50. *Garrido, C., Bruey, J.M., Fromentin, A., Hammann, A., Arrigo, A.P., Solary, E.* (1999) *FASEB J.*, **13**, 2061–2070.
51. *Garrido, C., Fromentin, A., Bonnotte, B., Favre, N., Moutet, M., Arrigo, A.P., Mehlen, P., Solary, E.* (1998) *Cancer Res.*, **58**, 5495–5499.
52. *Garrido, C., Gurbuxani, S., Ravagnan, L., Kroemer, G.* (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **286**, 433–442.
53. *Garrido, C., Mehlen, P., Fromentin, A., Hammann, A., Assem, M., Arrigo, A.P., Chauffert, B.* (1996) *Eur. J. Biochem.*, **237**, 653–659.
54. *Garrido, C., Ottavi, P., Fromentin, A., Hammann, A., Arrigo, A.P., Chauffert, B., Mehlen, P.* (1997) *Cancer Res.*, **57**, 2661–2667.
55. *Gerthoffer, W.T., Gunst, S.J.* (2001) *J. Appl. Physiol.*, **91**, 963–972.
56. *Goldman, J.E., Corbin, E.* (1991) *Am. J. Pathol.*, **139**, 933–938.
57. *Guay, J., Lambert, H., Gingras-Breton, G., Lavoie, J.N., Huot, J., Landry, J.* (1997) *J. Cell Sci.*, **110**, 357–368.
58. *Guenal, I., Sidoti-de Fraisse, C., Gaudmer, S., Mignotte, B.* (1997) *Oncogene*, **15**, 347–360.
59. *Guo, Z., Cooper, L.F.* (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **270**, 183–189.
60. *Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H.E., Chen, S., Saibil, H.R., Buchner, J.* (1999) *EMBO J.*, **18**, 6744–6751.
61. *Head, M.W., Goldman, J.E.* (2000) *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **26**, 304–312.
62. *Hedges, J.C., Dechert, M.A., Yamboliev, I.A., Martin, J.L., Hickey, E., Weber, L.A., Gerthoffer, W.T.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 24211–24219.
63. *Horwitz, J., Bova, M., Huang, Q.L., Ding, L., Yaron, O., Lowman, S.* (1998) *Int. J. Biol. Macromol.*, **22**, 263–269.
64. *Horwitz, J., Huang, Q.L., Ding, L., Bova, M.P.* (1998) *Methods Enzymol.*, **290**, 365–383.
65. *Huot, J., Houle, F., Spitz, D.R., Landry, J.* (1996) *Cancer Res.*, **56**, 273–279.
66. *Huot, J., Lambert, H., Lavoie, J.N., Guimond, A., Houle, F., Landry, J.* (1995) *Eur. J. Biochem.*, **227**, 416–427.
67. *Ingolia, T.D., Craig, E.A.* (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2360–2364.
68. *Ito, H., Kamei, K., Iwamoto, I., Inaguma, Y., Kato, K.* (2001) *Exp. Cell Res.*, **266**, 213–221.
69. *Ito, H., Okamoto, K., Nakayama, H., Isobe, T., Kato, K.* (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 29934–29941.
70. *Ito, T., Kozawa, O., Tanabe, K., Niwa, M., Matsuno, H., Sakai, N., Ito, H.*



- Kato, K., Uematsu, T.* (2000) *Hypertension*, **35**, 673–678.
71. *Iwaki, T., Kume–Iwaki, A., Liem, R.K., Goldman, J.E.* (1989) *Cell*, **57**, 71–78.
  72. *Iwaki, T., Wisniewski, T., Iwaki, A., Corbin, E., Tomokane, N., Tateishi, J., Goldman, J.E.* (1992) *Am. J. Pathol.*, **140**, 345–356.
  73. *Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., Buchner, J.* (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 1517–1520.
  74. *Kamradt, M.C., Chen, F., Cryns, V.L.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 16059–16063.
  75. *Kantorow, M., Horwitz, J., van Boekel, M.A., de Jong, W.W., Piatigorsky, J.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 17215–17220.
  76. *Kantorow, M., Piatigorsky, J.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 3112–3116.
  77. *Kappe, G., Verschuure, P., Philipsen, R.L., Staaldin, A.A., Van de Boogaart, P., Boelens, W.C., De Jong, W.W.* (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, **1520**, 1–6.
  78. *Kapranos, N., Kominea, A., Konstantinopoulos, P.A., Savva, S., Artelaris, S., Vandonos, G., Sotiropoulou–Bonikou, G., Papavassiliou, A.G.* (2002) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **128**, 426–432.
  79. *Kato, K., Goto, S., Inaguma, Y., Hasegawa, K., Morishita, R., Asano, T.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 15302–15309.
  80. *Kato, K., Hasegawa, K., Goto, S., Inaguma, Y.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 11274–11278.
  81. *Kato, K., Ito, H., Kamei, K., Inaguma, Y., Iwamoto, I., Saga, S.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 28346–28354.
  82. *Kato, K., Shinohara, H., Goto, S., Inaguma, Y., Morishita, R., Asano, T.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 7718–77125.
  83. *Kato, K., Shinohara, H., Kurobe, N., Inaguma, Y., Shimizu, K., Ohshima, K.* (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1074**, 201–208.
  84. *Kawazoe, Y., Tanabe, M., Nakai, A.* (1999) *FEBS Lett.*, **455**, 271–275.
  85. *Kelley, M.J., David, L.L., Iwasaki, N., Wright, J., Shearer, T.R.* (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 18844–18849.
  86. *Kim, K.K., Kim, R., Kim, S.H.* (1998) *Nature*, **394**, 595–599.
  87. *Kim, R., Kim, K.K., Yokota, H., Kim, S.H.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9129–9133.
  88. *Koteiche, H.A., Berengian, A.R., Mchaourab, H.S.* (1998) *Biochemistry*, **37**, 12681–12688.
  89. *Krief, S., Faivre, J.F., Robert, P., Le Douarin, B., Brument–Larignon, N., Lefrere, I., Bouzyk, M.M., Anderson, K.M., Greller, L.D., Tobin, F.L., Souchet, M., Bril, A.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 36592–36600.
  90. *Lambert, H., Charette, S.J., Bernier, A.F., Guimond, A., Landry, J.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 9378–9385.
  91. *Landry, J., Lambert, H., Zhou, M., Lavoie, J.N., Hickey, E., Weber, L.A., Anderson, C.W.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 794–803.
  92. *Larsen, J.K., Yamboliev, I.A., Weber, L.A., Gerthoffer, W.T.* (1997) *Am. J. Physiol.*, **273**, L930–940.
  93. *Lee, G.J., Pokala, N., Vierling, E.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 10432–10438.
  94. *Lee, G.J., Roseman, A.M., Saibil, H.R., Vierling, E.* (1997) *EMBO J.*, **16**, 659–671.
  95. *Lee, G.J., Vierling, E.* (2000) *Plant Physiol.*, **122**, 189–198.



96. *Leroux, M.R., Ma, B.J., Batelier, G., Melki, R., Candido, E.P.* (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 12847–12853.
97. *Leroux, M.R., Melki, R., Gordon, B., Batelier, G., Candido, E.P.* (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 24646–24656.
98. *Lindner, R.A., Carver, J.A., Ehrnsperger, M., Buchner, J., Esposito, G., Behlke, J., Lutsch, G., Kotlyarov, A., Gaestel, M.* (2000) *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1923–1932.
99. *Lindner, R.A., Kapur, A., Carver, J.A.* (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 27722–27729.
100. *Lindner, R.A., Treweek, T.M., Carver, J.A.* (2001) *Biochem. J.*, **354**, 79–87.
101. *Lindquist, S., Craig, E.A.* (1988) *Annu. Rev. Genet.*, **22**, 631–677.
102. *Lindquist, S., Kim, G.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5301–5306.
103. *Litt, M., Kramer, P., LaMorticella, D.M., Murphey, W., Lovrien, E.W., Weleber, R.G.* (1998) *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 471–474.
104. *Lowe, J., McDermott, H., Pike, I., Spendlove, I., Landon, M., Mayer, R.J.* (1992) *J. Pathol.*, **166**, 61–68.
105. *MacRae, T.H.* (2000) *Cell Mol. Life Sci.*, **57**, 899–913.
106. *Maizels, E.T., Peters, C.A., Kline, M., Cutler, R.E. Jr, Shanmugam, M., Hunzicker-Dunn, M.* (1998) *Biochem. J.*, **332**, 703–712.
107. *Mao, Y.W., Xiang, H., Wang, J., Korsmeyer, S., Reddan, J., Li, D.W.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 43435–43445.
108. *Mchaourab, H.S., Berengian, A.R., Koteiche, H.A.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 14627–14634.
109. *Mehlen, P., Coronas, V., Ljubic-Thibal, V., Ducasse, C., Granger, L., Jourdan, F., Arrigo, A.P.* (1999) *Cell Death Differ.*, **6**, 227–233.
110. *Mehlen, P., Kretz-Remy, C., Preville, X., Arrigo, A.P.* (1996) *EMBO J.*, **15**, 2695–2706.
111. *Mehlen, P., Mehlen, A., Godet, J., Arrigo, A.P.* (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 31657–31665.
112. *Mehlen, P., Preville, X., Chareyron, P., Briolay, J., Klemenz, R., Arrigo, A.P.* (1995) *J. Immunol.*, **154**, 363–374.
113. *Mehlen, P., Schulze-Osthoff, K., Arrigo, A.P.* (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 16510–16514.
114. *Merck, K.B., De Haard-Hoekman, W.A., Oude Essink, B.B., Bloemendal, H., De Jong, W.W.* (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1130**, 267–276.
115. *Merck, K.B., Groenen, P.J., Voorter, C.E., de Haard-Hoekman, W.A., Horwitz, J., Bloemendal, H., de Jong, W.W.* (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 1046–1052.
116. *Miron, T., Vancompernelle, K., Vandekerckhove, J., Wilchek, M., Geiger, B.* (1991) *J. Cell. Biol.*, **114**, 255–261.
117. *Miron, T., Wilchek, M., Geiger, B.* (1988) *Eur. J. Biochem.*, **178**, 543–553.
118. *Muchowski, P.J., Clark, J.I.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 1004–1009.
119. *Muchowski, P.J., Hays, L.G., Yates, J.R. 3<sup>rd</sup>, Clark, J.I.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 30190–30195.
120. *Narberhaus, F.* (2002) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **66**, 64–93.
121. *Netzer, W.J., Hartl, F.U.* (1998) *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 68–73.
122. *Oesterreich, S., Weng, C.N., Qiu, M., Hilsenbeck, S.G., Osborne, C.K.*

- Fuqua, S.A.* (1993) *Cancer Res.*, **53**, 4443–4448.
123. *Ortwerth, B.J., Slight, S.H., Prabhakaram, M., Sun, Y., Smith, J.B.* (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1117**, 207–215.
124. *Oya, T., Hattori, N., Mizuno, Y., Miyata, S., Maeda, S., Osawa, T., Uchida, K.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 18492–18502.
125. *Panasenko, O.O., Seit Nebi, A., Bukach, O.V., Marston, S.B., Gusev, N.B.* (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1601**, 64–74.
126. *Parsell, D.A., Lindquist, S.* (1993) *Annu. Rev. Genet.*, **27**, 437–496.
127. *Parsell, D.A., Sanchez, Y., Stitzel, J.D., Lindquist, S.* (1991) *Nature*, **353**, 270–273.
128. *Paul, C., Arrigo, A.P.* (2000) *Exp. Gerontol.*, **35**, 757–766.
129. *Paul, C., Manero, F., Gonin, S., Kretz-Remy, C., Viroit, S., Arrigo, A.P.* (2002) *Mol. Cell Biol.*, **22**, 816–834.
130. *Perng, M.D., Cairns, L., van den IJssel P., Prescott, A., Hutcheson, A.M., Quinlan, R.A.* (1999) *J. Cell Sci.*, **112**, 2099–2112.
131. *Plater, M.L., Goode, D., Crabbe, M.J.* (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 28558–28566.
132. *Pollack, M., Phaneuf, S., Dirks, A., Leeuwenburgh, C.* (2002) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **959**, 93–107.
133. *Preville, X., Salvemini, F., Giraud, S., Chauffour, S., Paul, C., Stepien, G., Ursini, M.V., Arrigo, A.P.* (1999) *Exp. Cell Res.*, **247**, 61–78.
134. *Rajaraman, K., Raman, B., Ramakrishna, T., Rao, C.M.* (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **249**, 917–921.
135. *Raman, B., Ramakrishna, T., Rao, C.M.* (1995) *FEBS Lett.*, **365**, 133–136.
136. *Raman, B., Ramakrishna, T., Rao, C.M.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 19888–19892.
137. *Reddy, G.B., Das, K.P., Petrash, J.M., Surewicz, W.K.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 4565–4570.
138. *Rembold, C.M., O'Connor, M., Clarkson, M., Wardle, R.L., Murphy, R.A.* (2001) *J. Appl. Physiol.*, **91**, 1460–1466.
139. *Richards, E.H., Hickey, E., Weber, L., Master, J.R.* (1996) *Cancer Res.*, **56**, 2446–2451.
140. *Rogalla, T., Ehrnsperger, M., Preville, X., Kotlyarov, A., Lutsch, G., Ducasse, C., Paul, C., Wieske, M., Arrigo, A.P., Buchner, J., Gaestel, M.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 18947–18956.
141. *Roy, S.K., Hiyama, T., Nakamoto, H.* (1999) *Eur. J. Biochem.*, **262**, 406–416.
142. *Sakamoto, H., Mashima, T., Yamamoto, K., Tsuruo, T.* (2002) *J. Biol. Chem.*, in press.
143. *Schafer, C., Ross, S.E., Bragado, M.J., Groblewski, G.E., Ernst, S.A., Williams, J.A.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 24173–24180.
144. *Schraufstatter, I.U., Hyslop, P.A., Hinshaw, D.B., Spragg, R.G., Sklar, L.A., Cochrane, C.G.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4908–4912.
145. *Schulze-Osthoff, K., Krammer, P.H., Droge, W.* (1994) *EMBO J.*, **13**, 4587–4596.
146. *Sharma, K.K., Kaur, H., Kester, K.* (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **239**, 217–222.
147. *Sharma, K.K., Kaur, H., Kumar, G.S., Kester, K.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 8965–8970.

148. Sharma, K.K., Kumar, G.S., Murphy, A.S., Kester, K. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 15474–15478.
149. Sharma, K.K., Kumar, R.S., Kumar, G.S., Quinn, P.T. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 3767–3771.
150. Smith, C.C., Yu, Y.X., Kulka, M., Aurelian, L. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 25690–25699.
151. Smulders, R.H., de Jong, W.W. (1997) *FEBS Lett.*, **409**, 101–104.
152. Smulders RHPH, Carver, J.A., Lindner, R.A., van Boekel, M.A., Bloemendal, H., de Jong, W.W. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 29060–29066.
153. Smykal, P., Masin, J., Hrdy, I., Kono-pasek, I., Zarsky, V. (2000) *Plant J.*, **23**, 703–713.
154. Sobott, F., Benesch, J.L., Vierling, E., Robinson, C.V. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 38921–38929.
155. Spector, A., Chiesa, R., Sredy, J., Garner, W. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4712–4716.
156. Spector, N.L., Ryan, C., Samson, W., Levine, H., Nadler, L.M., Arrigo, A.P. (1993) *J. Cell Physiol.*, **156**, 619–625.
157. Srinivasan, A.N., Nagineni, C.N., Bhat, S.P. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 23337–23341.
158. Stahl, J., Wobus, A.M., Ihrig, S., Lutsch, G., Bielka, H. (1992) *Differentiation*, **51**, 33–37.
159. Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D.G., Cohen, P., Gaestel, M. (1992) *FEBS Lett.*, **313**, 307–313.
160. Studer, S., Narberhaus, F. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 37212–37218.
161. Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., Nagata, S. (1993) *Cell*, **75**, 1169–1178.
162. Sugden, P.H., Clerk, A. (1998) *Circ. Res.*, **83**, 345–352.
163. Sugiyama, Y., Suzuki, A., Kishikawa, M., Akutsu, R., Hirose, T., Wayne, M.M., Tsui, S.K., Yoshida, S., Ohno, S. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 1095–1104.
164. Sun, T.X., Das, B.K., Liang, J.J. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 6220–6225.
165. Sun, T.X., Liang, J.J. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 286–290.
166. Suzuki, A., Sugiyama, Y., Hayashi, Y., Nyu-i, N., Yoshida, M., Nonaka, I., Ishiura, S., Arahata, K., Ohno, S. (1998) *J. Cell Biol.*, **140**, 1113–1124.
167. Tetu, B., Lacasse, B., Bouchard, H.L., Lagace, R., Huot, J., Landry, J. (1992) *Cancer Res.*, **52**, 2325–2328.
168. Tezel, G., Wax, M.B. (2000) *J. Neurosci.*, **20**, 3552–3562.
169. Tissieres, A., Mitchell, H.K., Tracy, U.M. (1974) *J. Mol. Biol.*, **84**, 389–398.
170. van Montfort, R.L., Basha, E., Friedrich, K.L., Slingsby, C., Vierling, E. (2001) *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 1025–1030.
171. Veinger, L., Diamant, S., Buchner, J., Goloubinoff, P. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 11032–11037.
172. Vicart, P., Caron, A., Guicheney, P., Li, Z., Prevost, M.C., Faure, A., Chateau, D., Chapon, F., Tome, F., Dupret, J.M., Paulin, D., Fardeau, M. (1998) *Nat. Genet.*, **20**, 92–95.
173. Wagstaff, M.J., Collaco-Moraes, Y., Smith, J., de Belleruche, J.S., Coffin, R.S., Latchman, D.S. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 5061–5069.
174. Wang, K., Spector, A. (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 6335–6345.

175. Wang, P., Bitar, K.N. (1998) *Am. J. Physiol.*, **275**, G1454–1462.
176. Wang, Y., Xu, A., Pearson, R.B., Cooper, G.J. (1999) *FEBS Lett.*, **462**, 25–30.
177. Waters, E.R., Vierling, E. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 14394–14399.
178. Wymann, M.P., Pirola, L. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1436**, 127–150.
179. Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H.Y., Baltimore, D. (1997) *Cell*, **89**, 1067–1076.
180. Zantema, A., Verlaan-De Vries, M., Maasdam, D., Bol, S., van der Eb, A. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 12936–12941.
181. Zhou, M., Lambert, H., Landry, J. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 35–43.
182. Zu, Y.L., Ai, Y., Huang, C.K. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 202–206.