

МУТАЦИИ МАЛЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА И ВРОЖДЕННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА

©2012 г. П. Н. ДАЦКЕВИЧ*, В. В. НЕФЁДОВА*,
М. В. СУДНИЦЫНА, Н. Б. ГУСЕВ

Кафедра биохимии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова, Москва

I. Введение. II. Структура и свойства малых белков теплового шока человека. III. Мутации малых белков теплового шока и врожденные заболевания человека. IV. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Малые белки теплового шока образуют большую группу белков, имеющих молекулярную массу в интервале от 12 до 43 кДа и экспрессируемых практически повсеместно в клетках архей, бактерий, растений и животных [1–3]. Все малые белки теплового шока содержат в своем составе так называемый α -кристаллиновый домен, состоящий из 80–100 аминокислотных остатков [4]. На N-конце α -кристаллинового домена располагается варибельный по размеру и структуре N-концевой домен, а на C-конце кристаллинового домена располагается короткий, высоко подвижный и мало упорядоченный C-концевой домен [1]. Различия в размере N- и C-концевых доменов обуславливают довольно значительные различия в молекулярных массах различных малых белков теплового шока. В тканях человека экспрессируются 10 различных малых белков теплового шока, получивших обозначения HspB1–HspB10 [5]. Некоторые представители семейства малых белков теплового шока, такие как HspB1 (Hsp27), HspB5 (α B-кристаллин), HspB6 (Hsp20)

Принятые сокращения: sHsp (small heat shock proteins) – малые белки теплового шока.

Адрес для корреспонденции: NBGusev@mail.ru.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 010-04-00026 и № 12-04-31043.

* Оба автора внесли одинаковый вклад в подготовку данной работы.

и HspB8 (Hsp22) экспрессируются повсеместно, в то время как остальные малые белки теплового шока преимущественно экспрессируются только в определенных тканях [6]. Малые белки теплового шока выполняют важные функции в поддержании жизнеспособности клеток в различных неблагоприятных условиях и часто обозначаются как «белки домашнего хозяйства» (house-keeping proteins). Механизм функционирования различных малых белков теплового шока довольно сильно различается [7, 8]. Большинство представителей семейства малых белков теплового шока способно предотвращать агрегацию неправильно свернутых или частично денатурированных белков и передавать эти неправильно свернутые белки АТР-зависимым шаперонам (Hsp60, Hsp70), которые способны обеспечивать их частичную или полную ренатурацию [2, 3, 5, 9]. Некоторые представители семейства малых белков теплового шока участвуют в регуляции процессов убиквитинилирования и последующей деградации денатурированных белков в протеасомах или в автофагосомах [10, 11]. Помимо защиты клеток от накопления агрегированных денатурированных белков малые белки теплового шока участвуют во многих других жизненно важных процессах. Установлена роль малых белков теплового шока в процессах апоптоза [12, 13], в процессах защиты клеток от окислительного шока [14], регуляции функционирования цитоскелета и сократительного аппарата различных клеток [15, 16], а также в регуляции активности различных ферментов [17]. В связи с тем, что малые белки теплового шока участвуют в регуляции многочисленных внутриклеточных процессов, изменения в структуре и свойствах малых белков теплового шока могут приводить к возникновению различных патологических процессов. Действительно, оказалось, что мутации малых белков теплового шока коррелируют с развитием различных врожденных заболеваний человека. Несколько ранее опубликованных обзоров было посвящено описанию различных мутаций малых белков теплового шока человека и различных патологий, которые могут быть связаны с этими мутациями [10, 18–20]. Тем не менее, количество обнаруживаемых мутаций малых белков теплового шока увеличивается с каждым днем и при этом молекулярные механизмы, лежащие в основе патологических состояний, остаются недостаточно изученными. По этой причине мы попытаемся суммировать последние данные о мутациях малых белков теплового шока и высказать предположения о том, почему мутации малых белков теплового шока могут влиять на возникновение различных патологий человека.

II. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА МАЛЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА ЧЕЛОВЕКА

Как уже отмечалось, кристаллиновый домен, состоящий из 80–100 аминокислотных остатков, является отличительным признаком и обязательным элементом структуры практически всех малых белков теплового шока (рис. 1). Этот домен содержит в своем составе 8 (у бактерий и растений) [21, 22] или 7 (у млекопитающих) [21–23] β -складок, упакованных в два листа, образующих довольно компактную структуру. Структура кристаллинового домена малых белков теплового шока млекопитающих достаточно консервативна, при этом $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 9$ и $\beta 8$ входят в состав одного складчатого листа, а $\beta 6$ – $\beta 7$, $\beta 5$ и $\beta 4$ входят в состав второго складчатого листа [23].

Кристаллиновый домен играет ключевую роль в образовании димеров малых белков теплового шока. Результаты исследований последних лет свидетельствуют о том, что антипараллельно расположенные объединенные $\beta 6$ – $\beta 7$ складки двух соседних мономеров малых белков теплового шока образуют серию водородных связей, стабилизирующих структуру димера [21–23]. Из-за большой подвижности и склонности к образованию высокоподвижных олигомеров до сих пор не удалось получить данные о трехмерной структуре ни одного из полноразмерных малых белков теплового шока, и большинство структурных исследований было выполнено на изолированных кристаллиновых фрагментах этих белков. Все проведенные до последнего времени исследования не ставят под сомнение тот факт, что стабилизация структуры димеров малых белков теплового шока обеспечивается за счет серии водородных связей, образованных антипараллельными $\beta 6$ – $\beta 7$ складками двух соседних мономеров. При этом некоторые экспериментальные данные свидетельствуют о том, что указанные складки могут как бы скользить друг относительно друга [21, 22], что может приводить к некоторому изменению длины области перекрытия этих складок и влиять на взаимную ориентацию соседних мономеров. До сих пор

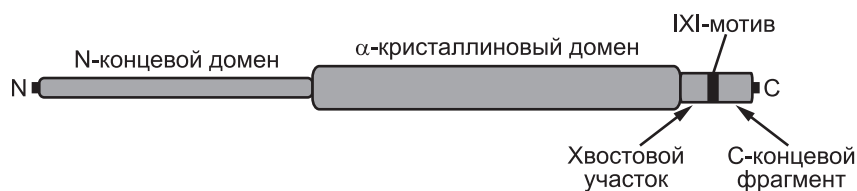


Рис. 1. Схема строения малых белков теплового шока.

нет однозначных данных о том, что такого рода «скольжение» $\beta 6$ – $\beta 7$ складок возможно в случае полноразмерных малых белков теплового шока в составе образуемых ими крупных олигомеров [23, 24]. Тем не менее, считается, что изменение рН или посттрансляционные модификации (такие как фосфорилирование определенных участков в структуре кристаллинового домена или поблизости от него) могут существенно ослаблять прочность связи между мономерами и приводить к диссоциации достаточно стабильных димеров малых белков теплового шока [25, 26].

Помимо того, что кристаллиновый домен играет важную роль в образовании димеров, этот домен содержит в своем составе несколько участков, обеспечивающих взаимодействие малых белков теплового шока с частично денатурированными белками-субстратами. Несмотря на то, что данные литературы не всегда однозначны, считается, что остатки, входящие в состав складок $\beta 3$, $\beta 6$ – $\beta 7$, $\beta 8$ и $\beta 9$ могут участвовать в связывании белков-мишеней малых белков теплового шока [27–30]. Помимо этого, участки, расположенные в кристаллиновом домене, могут отвечать за взаимодействие малых белков теплового шока с белками цитоскелета. Например, участки петли, соединяющей $\beta 5$ и $\beta 6$ – $\beta 7$ складки α В-кристаллина (остатки 113–120), а также остатки, относящиеся к $\beta 8$ складке, участвуют во взаимодействии α В-кристаллина и тубулина [31]. Таким образом, можно заключить, что кристаллиновый домен играет важную роль как в формировании димеров малых белков теплового шока, так и во взаимодействии малых белков теплового шока как с денатурированными, так и с интактными белками.

N-концевой домен малых белков теплового шока достаточно вариателен как по длине, так и по аминокислотному составу [1] (рис. 1). Как правило, этот участок молекулы мало упорядочен, хотя в случае некоторых малых белков теплового шока (таких как Hsp16,9 из пшеницы [32] или Tsp36 из паразитического червя *Taenia saginata* [33]) N-концевой домен содержит определенное количество α -спиралей. Из-за малой упорядоченности и высокой подвижности рентгеноструктурный анализ в большинстве случаев не позволяет точно установить положение N-концевых доменов большинства малых белков теплового шока [24]. Тем не менее, данные, полученные при исследовании структуры 24-членных олигомеров Hsp16,5 *Methanococcus jannaschii* [34] и 12-членных олигомеров Hsp16,9 пшеницы [32], свидетельствуют о том, что подвижные N-концевые домены располагаются в центре олигомеров, могут взаимодействовать между собой и участвуют в стабилизации крупных

олигомеров малых белков теплового шока. Недавно опубликованные результаты, полученные на α B-кристаллине [35], свидетельствуют о том, что N-концевой домен этого белка содержит в своем составе две коротких α -спирали ($\alpha 1$ и $\alpha 2$), а также две коротких β -складки ($\beta 1$ и $\beta 2$). Различные мономеры в составе крупного олигомера α B-кристаллина отличаются по ориентации и подвижности своих N-концевых доменов. При этом часть N-концевых доменов обращена в сторону внутренней полости шарообразного 24-членного олигомера этого белка и обеспечивает стабилизацию этой олигомерной структуры. N-концевые домены других мономеров α B-кристаллина имеют другую ориентацию и способны взаимодействовать с $\beta 3$ складкой кристаллинового домена того же мономера [35]. Способность подвижного N-концевого домена взаимодействовать с кристаллиновым доменом того же мономера была также отмечена в случае малого белка теплового шока Tsp36 из паразитического червя *Taenia saginata* [33]. Таким образом, подвижный N-концевой домен может взаимодействовать либо с кристаллиновым доменом, либо контактировать с подвижными N-концевыми доменами соседних димеров малых белков теплового шока и обеспечивать стабилизацию больших олигомерных комплексов.

В формировании указанных контактов принимают участие полуконсервативные последовательности (W/F)(D/E)PF и (F/L)D(Q/D)XFG, обнаруженные в структуре малых белков теплового шока млекопитающих [36, 37]. Действительно, удаление определенных участков N-концевого домена (и особенно участков, содержащих указанные последовательности) приводит к диссоциации крупных олигомеров малых белков теплового шока до димеров или тетрамеров [36, 38]. Важно отметить, что N-концевые домены многих малых белков теплового шока содержат в своем составе один или несколько участков фосфорилирования. Установлено, что в условиях *in vivo* HspB1 человека может быть фосфорилирован по остаткам Ser15, Ser78, Ser82 [39], HspB5 может быть фосфорилирован по остаткам Ser19, Ser45 и Ser59 [26], HspB6 – по Ser16 [16], и, наконец, HspB8 – по Ser24 и Ser/Thr87 [40, 41]. Часть указанных участков фосфорилирования (Ser15 HspB1; Ser19 HspB5; Ser16 HspB6; Ser24 HspB8) расположены вблизи от упомянутых выше гидрофобных полуконсервативных последовательностей. Другая часть участков фосфорилирования (Ser78 и Ser82 HspB1; Ser 59 HspB5; Ser/Thr87 HspB8) расположена на границе подвижного N-концевого домена и консервативного кристаллинового домена малых белков теплового шока (рис. 2). Фосфорилирование (или мутации, имитирующие

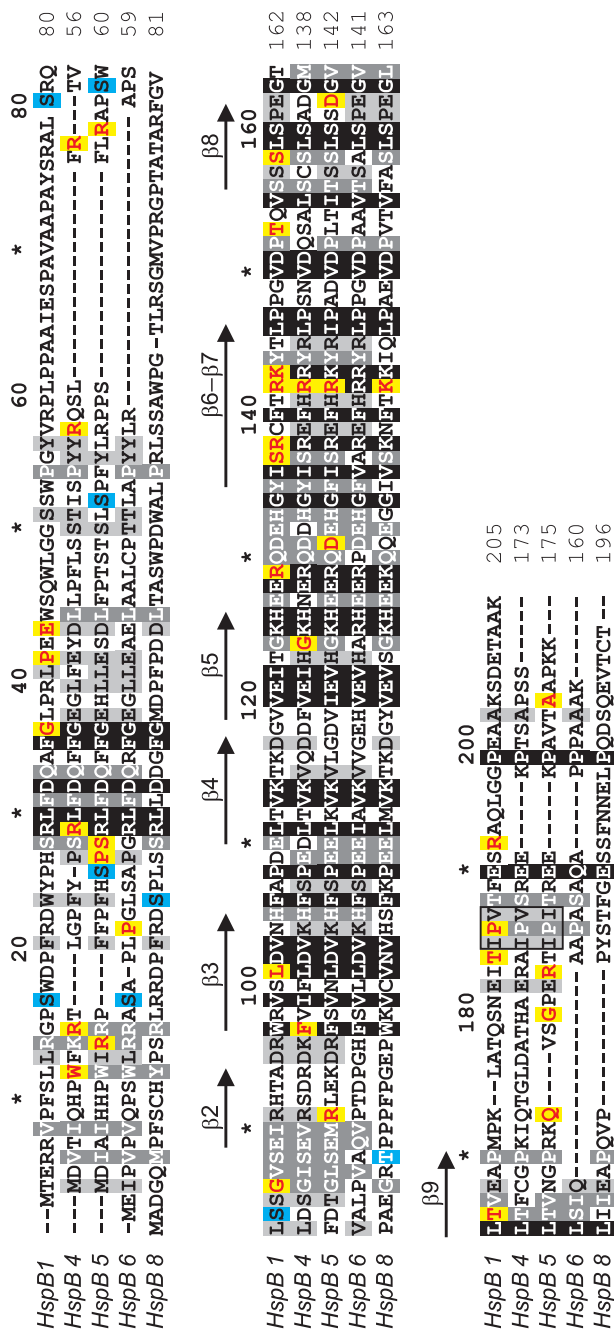


Рис. 2. Выравнивание первичных структур пяти малых белков теплового шока человека.

Идентичные или высоко гомологичные остатки, встречающиеся в структуре всех пяти белков, показаны на черном фоне, консервативные остатки, выявленные в структуре четырех или трех сравниваемых белков, показаны на темно- или светло-сером фоне. Консервативная последовательность IXI в С-концеюм участке белков заключена в рамку. Остатки, мутации которых описаны в литературе, обозначены красным цветом на желтом фоне. Фосфорилируемые остатки серина и треонина обозначены синим цветом. Стрелками обозначено приблизительное расположение β -складок в составе кристаллинового домена.

фосфорилирование), по всей видимости, влияют на структуру и/или ориентацию N-концевого домена и вызывают диссоциацию крупных олигомеров HspB1 [37, 42], изменения в структуре крупных олигомеров HspB5 [26, 43] и определенные изменения олигомерной структуры и шаперонной активности HspB8 [44]. Изменения шаперонной активности, вызываемые фосфорилированием малых белков теплового шока, могут быть следствием двух причин. Во-первых, как уже отмечалось, фосфорилирование может приводить к диссоциации N-концевого домена от кристаллинового домена и обнажению участков кристаллинового домена, отвечающих за связывание белков-субстратов. Во-вторых, фосфорилирование может влиять на связывание белков-субстратов с N-концевым доменом малых белков теплового шока. Действительно, данные, полученные на разных малых белках теплового шока, свидетельствуют о том, что N-концевой домен содержит в своем составе участки, отвечающие за связывание белков-субстратов [28, 45, 46]. Таким образом, N-концевой домен может взаимодействовать с кристаллиновым доменом того же мономера и может в силу высокой подвижности взаимодействовать с N-концевыми доменами соседних мономеров, обеспечивая стабилизацию крупных олигомеров малых белков теплового шока. Изменение ориентации N-концевого домена, вызванное фосфорилированием или изменением условий окружающей среды может, приводить к диссоциации крупных олигомеров малых белков теплового шока и изменению из шаперонной активности.

C-концевая область малых белков теплового шока, следующая за кристаллиновым доменом, как правило, довольно короткая по длине и может быть условно разделена на так называемый хвостовой участок, консервативную последовательность (I/V/L)–X–(I/V/L) (обычно обозначаемую как IXI мотив) и C-концевой фрагмент [24] (рис. 1). C-концевая область малых белков теплового шока очень вариабельна по длине и аминокислотному составу. При этом некоторые малые белки теплового шока человека, такие как HspB6 и HspB8, содержат только очень короткий хвостовой участок и лишены как IXI мотива, так и C-концевого фрагмента. C-концевая область малых белков теплового шока обладает высокой подвижностью [47, 48], имеет мало упорядоченную структуру и вследствие этого легко подвергается протеолизу [49, 50]. Данные рентгеноструктурного анализа, выполненного на полноразмерных малых белках теплового шока архей и растений [32, 34, 51], а также на кристаллиновых доменах малых белков теплового шока [21, 22] свидетельствуют о том, что консервативный гидрофобный участок IXI C-концевого

домена мономера, входящего в состав одного димера, может взаимодействовать с гидрофобной канавкой, образованной $\beta 4$ и $\beta 8$ складками кристаллинового домена мономера, входящего в состав второго димера. Более того, оказалось, что зачастую первичная структура вблизи указанного IXI мотива имеет вид палиндрома (например, в случае αB -кристаллина она имеет вид TIRIT). По этой причине указанный пептид может укладываться в гидрофобную канавку, образованную $\beta 4$ и $\beta 8$ складками кристаллинового домена, двумя разными способами [22]. Следствием этого может быть значительная гетерогенность контактов между соседними димерами малых белков теплового шока [24, 52]. Таким образом, можно заключить, что С-концевая консервативная последовательность IXI может играть важную роль в формировании крупных олигомеров малых белков теплового шока. В то же время при физиологических температурах длинный С-концевой фрагмент в основном находится в свободном состоянии [48, 52]. По всей видимости, взаимодействие IXI мотива с гидрофобной канавкой на поверхности кристаллинового домена находится под жестким термодинамическим контролем и зависит от структуры и подвижности всего длинного С-концевого фрагмента малых белков теплового шока. Действительно, удаление IXI мотива из С-концевой области малых белков теплового шока некоторых бактерий приводило к диссоциации крупных олигомеров [53, 54]. В то же время замена полярных или гидрофильных остатков С-концевой области αA -кристаллина на аналогичные по природе аминокислотные остатки не влияет на структуру или свойства белка, в то время как замена гидрофильных остатков гидрофобными сопровождается уменьшением подвижности С-концевой области [55]. Аналогичные результаты были получены и при исследовании Hsp25 мыши (ортолога HspB1 человека) [56]. Важно отметить, что, как правило, С-концевая область большинства малых белков теплового шока достаточна гидрофильна и это свойство оказывается особенно важным при предотвращении агрегации комплексов малых белков теплового шока с их белками-субстратами [56].

Как уже отмечалось, на поверхности малых белков теплового шока выявлено несколько участков, обеспечивающих их взаимодействие с белками-субстратами. Установлено, что в С-концевой области малых белков теплового шока расположен один из участков связывания частично денатурированных белков [28, 46]. Кроме того, С-концевая область малых белков теплового шока может участвовать в их взаимодействии с интактными белками-партнерами. Так, например, установлено, что С-концевая область αB -кристаллина участвует в его

взаимодействии с тубулином [31]. Важно отметить, что С-концевая область не только сама по себе может участвовать в связывании белков-мишеней, но эта область может влиять на взаимодействие белков-мишеней с кристаллиновым доменом малых белков теплового шока. Действительно, как уже отмечалось, благодаря консервативной последовательности IXI С-концевая область оказывается способной связываться с гидрофобным желобком, образованным $\beta 4$ и $\beta 8$ складками α -кристаллинового домена. Этот гидрофобный желобок может также участвовать в связывании белков-мишеней [28]. По этой причине С-концевая область малых белков теплового шока может в определенных условиях выступать в качестве автоингибиторного участка и уменьшать шаперонную активность малых белков теплового шока. Завершая этот раздел, можно заключить, что короткая слабо упорядоченная С-концевая область малых белков теплового шока может участвовать в стабилизации крупных олигомеров малых белков теплового шока и может прямо или опосредованно влиять на их шаперонную активность и растворимость комплексов, образуемых малыми белками теплового шока и их белками-партнерами.

Охарактеризовав свойства отдельных элементов структуры, мы можем приступить к анализу свойств мутантных форм малых белков теплового шока, экспрессия которых коррелирует с некоторыми врожденными заболеваниями человека.

III. МУТАЦИИ МАЛЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА И НЕКОТОРЫЕ ВРОЖДЕННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА

Условно все мутации в структуре малых белков теплового шока могут быть разделены по месту их расположения (N-концевой домен, кристаллиновый домен или С-концевой участок) (рис. 2 и табл.), по типу заболеваний, возникновение которых коррелирует с теми или иными мутациями, и, наконец, по типу проявления указанных мутаций (аутосомно-рецессивный или аутосомно-доминантный тип). Для простоты мы будем придерживаться первого типа классификации, и будем анализировать мутации по месту их расположения в структуре малых белков теплового шока.

МУТАЦИИ HSPB1 (HSP27).

Большинство мутаций HspB1 наследуются по аутосомно-доминантному типу и коррелируют с возникновением дистальной врожденной моторной невропатии (distal hereditary motor neuropathy), часто обозначаемой в русскоязычной литературе как болезнь Шарко-Мари-Ту

Таблица.
Мутации малых белков теплового шока и врожденные заболевания человека

Белок	Мутация	Локализация	Заболевание и тип наследования	Ссылка
1	2	3	4	5
HspB1	G34R	N-концевой домен	ДВМН	[60]
	P39L	N-концевой домен	ДВМН /ШМТ2 (АД)	[57]
	E41K	N-концевой домен	ДВМН (АД)	[60]
	G84R	N-концевой домен	ДВМН /ШМТ2 (АД)	[57, 59]
	L99M	Кристаллиновый домен	ДВМН /ШМТ2 (АР)	[57]
	R127W	Кристаллиновый домен	ДВМН (АД)	[61]
	S135F/S135M	Кристаллиновый домен	ДВМН /ШМТ2 (АД)	[61]
	R136W/R136L	Кристаллиновый домен	ШМТ2 (АД)	[60, 61]
	R140G	Кристаллиновый домен	ДВМН /ШМТ2 (АД)	[57]
	K141Q	Кристаллиновый домен	ДВМН (АД)	[68]
	T151I	Кристаллиновый домен	ДВМН (АД)	[61]
	S156Y	Кристаллиновый домен	Непатогенный	[63]
	T164A	Кристаллиновый домен	ШМТ2 (АД)	[69]
	T180I	C-концевой домен	ДВМН /ШМТ2 (АД)	[70]
	P182L/P182S	C-концевой домен	ДВМН (АД)	[61, 72]
	R188W	C-концевой домен	ШМТ2	[60]
476_477delCT	C-концевой домен	ПН (АД)	[73]	
pGln175X	C-концевой домен	ШМТ2	[74]	
HspB3	R7S	N-концевой домен	МНП	[75]
HspB4	W9X	N-концевой домен	Катаракта (АР)	[78]
	R12C	N-концевой домен	Катаракта (АД)	[79, 80]
	R21L/R21W	N-концевой домен	Катаракта (АД)	[79–81]
	R49C	N-концевой домен	Катаракта (АД)	[82]
	R54C	N-концевой домен	Катаракта (АД, АР)	[80]
	F71L	Кристаллиновый домен	Возрастная катаракта	[83]
	G98R	Кристаллиновый домен	Катаракта (АД)	[86]
	R116C/R116H с.350_352delGST или R117/H, Y118del	Кристаллиновый домен	Катаракта	[79, 89, 90] [87]

Окончание табл. см. на сл. стр.

Окончание табл.

1	2	3	4	5
HspB5	R11H	N-концевой домен	Катаракта (АД)	[97]
	P20S	N-концевой домен	Катаракта (АД)	[98]
	Ser21Alafsx24	N-концевой домен	ММ (АР)	[100]
	R56W	N-концевой домен	Катаракта (АР)	[101, 102]
	R69C	Кристаллиновый домен	Катаракта (АД)	[87]
	D109H	Кристаллиновый домен	Катаракта, ММ (АД)	[96]
	c.343delT или Ser115Profxs14	Кристаллиновый домен	ММП (АР)	[104]
	R120G	Кристаллиновый домен	ДМП, катаракта (АД)	[105, 117]
	D140N	Кристаллиновый домен	Катаракта (АД)	[111]
	Q151X	С-концевой домен	ММ (АД)	[112, 113]
	G154S	С-концевой домен	ДМ	[112, 115, 116]
	R157H	С-концевой домен	ДКМП (АД)	[117]
	A171T	С-концевой домен	Катаракта (АД)	[80]
	450delA или K150fs_184X	С-концевой домен	Катаракта (АД)	[118]
464delCT или L155fs_163X	С-концевой домен	ММ (АД)	[113]	
HspB6	P20L	N-концевой домен	Уменьшение кардиопротекторной активности	[119]
HspB8	K141N/K141E	Кристаллиновый домен	ДВМН/ДВМН и ШМТ2 (АД)	[123, 124]

Сокращения: ДВМН – дистальная врожденная моторная невропатия; ДМП, связанная с десмином миопатия; ДКМП – дилатационная кардиомиопатия; ДМ – дистальная миопатия; ММП – миофибриллярная миопатия; МНП – моторная невропатия; ПН – периферическая невропатия; ШМТ2 – болезнь Шарко-Мари-Ту (Charcot-Marie-Tooth) второго типа. Тип наследования: АД – аутосомно-доминантный, АР – аутосомно-рецессивный.

второго типа или наследственной мотосенсорной невропатией. Эти заболевания проявляются в мышечной слабости и атрофии различных групп мышц. Отличительным признаком болезни Шарко-Мари-Ту считается изменение проведения импульсов по нервным волокнам и иные повреждения периферической нервной системы, затрагивающие как моторные, так и (в меньшей степени) сенсорные нейроны. Наследственная моторная невропатия является сходным заболеванием, при котором происходит повреждение только моторных нейронов без каких-либо изменений сенсорных нейронов [57]. Выделяют несколько клинико-диагностических форм болезни Шарко-Мари-Ту (ШМТ). В частности при болезни Шарко-Мари-Ту I типа (ШМТ1 или СМТ1) (описано 6 форм этого заболевания)

происходит повреждение миелиновой оболочки аксонов, а при болезни Шарко-Мари-Ту II типа (ШМТ2 или СМТ2) (описано 18 форм этого заболевания) происходит повреждение самих аксонов. Считается, что ведущими факторами в возникновении болезни ШМТ I типа являются мутации различных генов, кодирующих белки, участвующие в образовании миелиновых оболочек. В то же время ведущими факторами в возникновении болезни ШМТ2 считаются многочисленные и разнообразные мутации в генах, кодирующих кинезиноподобные белки, цитоплазматический динеин, белки промежуточных филаментов, белок Rab7a, участвующий в регуляции эндоцитоза и везикулярного транспорта и другие белки [58]. В последнее время накапливаются сведения о том, что мутации малых белков теплового шока также могут быть причиной возникновения болезни Шарко-Мари-Ту II типа или наследственной моторной невропатии.

В частности, было выявлено довольно много мутаций HspB1, которые тем или иным образом связаны с появлением синдромов, характерных для моторной невропатии или болезни Шарко-Мари-Ту II типа. В N-концевой области HspB1 обнаружены мутации G34R, P39L, E41K и G84R [57, 59, 60] (рис. 2, табл.). Первые три мутации (G34R, P39L, E41K) располагаются в непосредственной близости от полуконсервативной области (RLFDQAFG), которая, как уже отмечалось, может участвовать во взаимодействии N-концевого домена HspB1 с его кристаллиновым доменом. Четвертая точечная мутация G84R располагается в непосредственной близости от потенциальных участков фосфорилирования (Ser78/Ser82) HspB1 и, вероятно, может влиять на постулируемое в литературе [39] фосфорилирование этого белка MAPKAP2 киназой. Таким образом, мутирование указанных участков может влиять на структуру или подвижность N-концевого домена, что в свою очередь может сказываться на внутри- или межсубъединичных взаимодействиях HspB1. В этой связи следует упомянуть о том, что мутация G84R сопровождается накоплением агрегатов мутированного белка в клетках HeLa [59].

Наибольшее количество мутаций выявлено в кристаллиновом домене HspB1 (рис. 2, табл.). Точечная мутация L99M приводит к замене одной гидрофобной аминокислоты (лейцина) на другую гидрофобную аминокислоту (метионин). Эта точечная мутация расположена в третьей β -складке кристаллинового домена. Установлено, что эта мутация имеет аутосомно-рецессивный характер и сопровождается возникновением симптомов, характерных для дистальной врожденной моторной невропатии или болезни Мари-Шарко-Ту II типа [57]. Физико-химические свойства мутанта L99M не исследованы, однако

можно предположить, что указанная мутация влияет на структуру кристаллинового домена и/или на взаимодействие мономеров HspB1 в составе димеров.

Шесть следующих точечных мутаций (R127W, S135F/S135M, R136W, R140G, K141Q) расположены в непосредственной близости друг от друга и находятся либо в составе петли, соединяющей $\beta 5$ и $\beta 6$ – $\beta 7$ складки (R127W), либо в непосредственной близости или в составе $\beta 6$ – $\beta 7$ складки кристаллинового домена HspB1 (рис. 2). Все эти мутации сопровождаются появлением симптомов, характерных для болезни Шарко-Мари-Ту II типа и наследуются по аутосомно-доминантному типу [57, 61]. Мутация R127W была описана во французских и бельгийских семьях [62]. Недавно опубликованные данные свидетельствуют о том, что мутация R127W приводит к увеличению вероятности диссоциации крупных олигомеров HspB1 и накоплению мономерных форм этого белка, которые обладают повышенной шаперонной активностью и более эффективно, чем белок дикого типа, взаимодействуют с белками-субстратами [63]. Вероятно, вследствие того, что указанная мутация приводит к экспонированию участков, обеспечивающих связывание белков-мишеней, оказалось, что мутация R127W увеличивает средство HspB1 к тубулину, следствием чего является стабилизация микротрубочек [64]. Высказывается предположение, что повышенная стабилизация микротрубочек, вызванная мутантными формами HspB1, заставляет клетку искать альтернативные пути регуляции структуры микротрубочек. Вследствие этого увеличивается активность деацетилаз, которые обеспечивают деацетилирование тубулина, что приводит к дестабилизации и разборке микротрубочек [65]. Мутантные формы HspB1 не способны препятствовать деацетилированию тубулина и разборке микротрубочек, и вследствие этого экспрессия R127W мутанта на поздних стадиях развития болезни Шарко-Мари-Ту приводит к нарушению аксонального транспорта и появлению всех симптомов, характерных для этого заболевания. Считается, что частичная диссоциация крупных олигомеров HspB1, вызываемая мутацией R127W, обусловлена тем, что появление большого по объему остатка триптофана в петле, соединяющей $\beta 5$ и $\beta 6$ – $\beta 7$ складки, приводит к разрушению серии водородных связей, обеспечивающих субъединичные контакты в составе димеров HspB1 [63].

В литературе описаны мутации двух соседних остатков (S135F/S135M и R136W) в структуре HspB1 [57, 61, 66] (рис. 2, табл.). Оба остатка располагаются в $\beta 6$ – $\beta 7$ складке и для мутаций обоих остатков характерно аутосомно-доминантное наследование, приводящее к

возникновению симптомов, характерных для болезни Шарко-Мари-Ту II типа. Мутации 135 остатка (также как и мутация 127 остатка) сопровождаются увеличением шаперонной активности и частичной диссоциацией крупных олигомеров HspB1 [63]. Мутация S135F приводит к увеличению сродства HspB1 к тубулину и повышенной стабилизации микротрубочек в досимптомный период развития болезни Шарко-Мари-Ту [64, 67]. Компенсаторное деацетилирование тубулина в клетках, экспрессирующих S135F, приводит к разборке микротрубочек и нарушениям аксонального транспорта [65]. Помимо этого установлено, что экспрессия S135F сопровождается нарушением сборки и частичной агрегацией белков нейрофиламентов [61]. Высказывается предположение, что все описанные эффекты обусловлены тем, что замена небольшого по размеру гидрофильного остатка серина на объемистые гидрофобные остатки фенилаланина (и, вероятно, метионина) приводит к нарушению контактов между двумя антипараллельными $\beta 6$ – $\beta 7$ складками соседних мономеров и частичной диссоциации олигомеров HspB1. В этой связи любопытно отметить, что точечная мутация R136W, также приводящая к возникновению симптомов болезни Мари-Шарко-Ту [61], не сопровождается значительными изменениями в шаперонной активности и диссоциацией крупных олигомеров HspB1 [63]. Высказывается предположение, что эта мутация не вызывает столь драматических изменений в субъединичных контактах HspB1, как мутация соседнего остатка S135 [63]. Получена линия трансгенных мышей, экспрессирующих мутант R136W человека, и установлено, что с возрастом у этих мышей развивается моторная аксонопатия [66]. Возможно, это связано с нарушением сборки нейрофиламентов [66]. Следует заметить, что различные элементы цитоскелета тесно связаны между собой, и поэтому изменения в сборке нейрофиламентов зачастую могут влиять на структуру и свойства микротрубочек и на аксональный транспорт.

Две следующих описанных в литературе мутации (R140G и K141Q) расположены поблизости друг от друга и входят в состав $\beta 6$ – $\beta 7$ складки кристаллинового домена (рис. 2). Следует заметить, что остаток R140 HspB1 является своеобразной «горячей точкой», и гомологичные ему остатки в структуре других малых белков теплового шока также подвержены мутированию, приводящему к возникновению различных врожденных заболеваний (рис. 2). Мутация R140G наследуется по аутосомно-доминантному механизму и сопровождается развитием симптомов, характерных для болезни Шарко-Мари-Ту II типа [57]. Насколько нам известно, физико-химические свойства мутанта R140G подробно не исследовались. Однако данные рентгеноструктурного

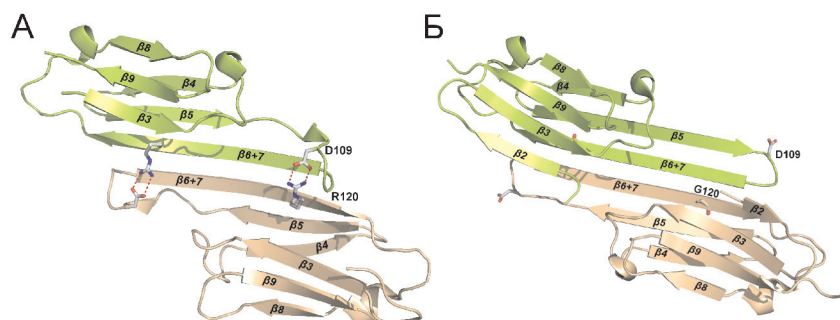


Рис. 3. Область взаимодействия двух соседних мономеров α B-кристаллина.

Показаны две антипараллельных складки $\beta 6$ - $\beta 7$ и расположение остатков D109 и R120, обеспечивающих стабилизацию межсубъединичных контактов в структуре α -кристаллинового домена α B-кристаллина дикого типа (PDB 2Y22) (A) и α -кристаллинового домена мутантной формы R120G/L137SeM α B-кристаллина (PDB 2Y1Z). Построено в программе PyMol на основе рентгеноструктурных данных Кларк и соавторов [88].

анализа кристаллинового домена малых белков теплового шока [21, 23] свидетельствует о том, что R140 HspB1 может образовывать солевой мостик с D129 соседнего мономера и таким образом стабилизирует контакты двух соседних мономеров. Аналогичные мостики обнаружены в структуре кристаллинового домена α B-кристаллина (рис.3). Вероятно, нарушение или ослабление контактов между мономерами HspB1 может быть одной из причин развития различных врожденных заболеваний. Недавно описанная в Японии мутация K141Q сопровождается возникновением симптомов, характерных для болезни Шарко-Мари-Ту II типа [68]. Мутированный остаток располагается в $\beta 6$ - $\beta 7$ складке, при этом предполагается, что этот остаток может участвовать либо в стабилизации структуры кристаллинового домена изолированного мономера [68], либо в стабилизации контактов между двумя мономерами в составе димера.

Две дополнительных описанных в литературе мутации располагаются в конце кристаллинового домена. При этом точечная мутация T151I приводит к возникновению симптомов болезни Шарко-Мари-Ту II типа [61, 62], а мутация S156Y не сопровождается какими-то патологическими изменениями [63]. Указанные мутации располагаются либо в петле, соединяющей $\beta 6$ - $\beta 7$ и $\beta 8$ складки (T151I), либо в составе $\beta 8$ складки кристаллинового домена (S156Y). Насколько нам известно, до последнего времени не было данных о физико-химических свойствах указанных мутантов, однако установлено, что указанные мутации не оказывают существенного влияния на шапел-

ронную активность HspB1 или его способность взаимодействовать с белками-мишенями [63].

Мутация T164A была обнаружена у одного из китайских пациентов, страдающих смешанной мотосенсорной невропатией (болезнью Шарко-Мари-Ту II типа) [69]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе возникновения этой патологии, остаются неизвестными.

Несколько мутаций HspB1 затрагивают его С-концевой участок (рис. 2, табл.). В итальянской семье выявлена точечная мутация T180I [70]. Эта мутация сопровождается возникновением симптомов, характерных для моторной аксональной невропатии с фенотипом, приписываемым болезни Шарко-Мари-Ту II типа или дистальной врожденной моторной невропатии. Физико-химические свойства мутированного белка не описаны. В то же время указанная мутация располагается в непосредственной близости от так называемого IXI мотива, расположенного в С-концевой части малых белков теплового шока и участвующего в стабилизации олигомерных форм этих белков [52]. Любопытно отметить, что указанная мутация приводит к образованию кластера, состоящего из 3 следующих друг за другом остатков изолейцина, что может изменять гидрофильность С-концевого участка и влиять на растворимость комплексов, образуемых HspB1 с белками-мишенями.

В литературе есть данные о двух мутациях остатка пролина, расположенного в положении 182 HspB1. Мутация P182L сопровождается развитием симптомов, характерных для врожденной дистальной моторной невропатии [61, 71]. При этом в клетках, экспрессирующих этот мутантный белок, наблюдается накопление нерастворимых агрегатов, в состав которых входят белки промежуточных филаментов и p150 динактин [71]. Мутантный HspB1 препятствует образованию нейрофиламентов, однако экспрессия мутантного белка не сопровождается существенными изменениями в распределении динактина или в транспорте митохондрий [71]. Важно подчеркнуть, что совместная экспрессия в клетке белка дикого типа и его P182L мутанта не способна защитить клетку от описанных патологических изменений. Вторая мутация остатка 182 (P182S) описана довольно поверхностно [72]. Эта мутация также сопровождается возникновением симптомов, характерных для врожденной дистальной моторной невропатии. Физико-химические свойства мутантов P182L и P182S до последнего времени не исследовались. Важно отметить, что остаток P182 входит в состав трипептида IPV, т.е. мотива, который обычно обозначается как IXI и который, как уже обсуждалось ранее, играет важную роль в формировании крупных олигомеров малых белков теплового шока

[21, 52]. Возможно, нарушение четверичной структуры, вызванное указанными мутациями, является одной из причин возникновения описанных врожденных заболеваний.

В одной из последних публикаций появились сведения еще об одной мутации в самом С-концевом участке HspB1. Показано, что мутация R188W сопровождается симптомами, характерными для болезни Шарко-Мари-Ту II типа [60]. Можно предположить, что одной из причин возникновения заболевания может быть либо изменение гидрофобности С-концевого участка, либо изменение олигомерного состояния, вызванное нарушением взаимодействия мономеров в составе олигомера.

В настоящее время в литературе описано две делеционные мутации HspB1. Первая мутация была обнаружена у итальянского ребенка, страдающего дистальной атрофией конечностей и арефлексией, возникшей после введения адсорбированной коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакцины. Указанная мутация состоит в делеции 476 и 477 нуклеотидов, сдвигу рамки считывания и преждевременной терминации трансляции из-за появления стоп-кодона. Эта мутация обозначается как 476_477delCT или pSer158fsX200 [73]. Этот мутированный белок имеет неизменную первичную структуру от первого до 158 остатков (т.е. практически неизменный N-концевой и кристаллиновый домен, лишенный девятой β -складки), а также необычный участок аминокислот от 159 до 200 остатков. Другими словами, этот белок не имеет нормального С-концевого участка. Физико-химические свойства этого белка не изучены, однако можно предположить, что из-за отсутствия IX мотива и измененной С-концевой последовательности этот мутант будет иметь измененную четвертичную структуру и, возможно, будет отличаться по механизму взаимодействия с белками мишенями.

Наконец, совсем недавно была описана еще одна делеционная мутация HspB1. В этом случае происходит точечная мутация, приводящая к замене 523 цитозина на тимин (с.523T>C) [74]. Вследствие этого происходит обрыв полипептидной цепи на Thr174 и такой мутантный белок будет иметь неизменную структуру N-концевого и кристаллинового доменов, но будет лишен подвижного С-концевого хвоста. Указанная мутация приводит к появлению симптомов, преимущественно характерных для дистальных невропатий. Свойства указанного мутанта не исследованы, однако можно предполагать, что возникновение указанной патологии обусловлено либо изменением четвертичной структуры HspB1, либо изменением его взаимодействия с белками-мишенями.

МУТАЦИИ МАЛОГО БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА HSPB3

В настоящее время описана только одна мутация HspB3, сопровождающаяся проявлением симптомов, характерных для аксональной моторной невропатии (табл.). В нейромышечном клиническом центре университета Огайо была выявлена мутация R7S, локализованная в самом начале N-концевого домена HspB3 [75]. В настоящее время только начато изучение свойств HspB3 дикого типа [76], поэтому трудно высказать убедительные предположения о том, как эта мутация влияет на структуру и свойства HspB3. В то же время довольно любопытно отметить, что точечные мутации как в N-концевом домене HspB1, так и точечные мутации в N-концевом домене HspB3 приводят к развитию сходных наследственных заболеваний.

МУТАЦИИ α A-КРИСТАЛЛИНА (HSPB4)

α A-кристаллин преимущественно экспрессируется в хрусталике и поэтому мутации этого белка в основном сопровождаются развитием различных форм катаракты [77], т.е. помутнением хрусталика, обусловленным агрегацией белков, входящих в состав этой своеобразной линзы (табл.).

Часть мутаций (W9X, R12C, R21L/R21W, R49C, R54C) расположена в N-концевой части молекулы (рис. 2, табл.). Аутосомно-рецессивная точечная мутация W9X, сопровождающаяся заменой одного нуклеотида (G на A), приводит к появлению стоп-кодона и преждевременной терминации трансляции на девятой аминокислоте [78]. При анализе больных с врожденной катарактой с синдромом микрокорнеа (роговица чрезмерно малого размера) были выявлены две мутации α A-кристаллина (R12C и R21W/R21L), расположенные в N-концевом домене этого белка [79, 80]. Любопытно отметить, что остатки аргинина в указанных положениях очень консервативны (рис. 2), при этом указанные остатки располагаются либо в непосредственной близости, либо входят в состав полуконсервативных последовательностей (W/F)(D/E)PF и (F/L)D(Q/D)XFG, участвующих в образовании межсубъединичных контактов в составе олигомеров малых белков теплового шока. Кроме того, высказывается предположение, что мутация R21L сопровождается довольно заметными изменениями гидрофобности N-концевого домена α A-кристаллина [81], что также может влиять на его межсубъединичные контакты или взаимодействие с белками-мишенями. Две следующих мутации (R49C и R54C) располагаются в области перехода от подвижного и мало упорядоченного N-концевого домена к консервативному и хорошо упорядоченному кри-

таллиновому домену. Обе мутации были выявлены при анализе врожденной детской катаракты [80, 82]. При трансфекции в эпителиальные клетки хрусталика α A-кристаллин дикого типа эффективно защищал клетки от действия ингибитора протеинкиназ стауроспорина, в то время как мутант R49C не был способен защищать клетки от апоптоза, вызванного стауроспорином [82]. Любопытно, что все описанные мутации, приводящие к развитию катаракты и происходящие в N-концевом домене (за исключением W9X), состоят в замене положительно заряженного остатка аргинина на нейтральные или ароматические остатки. Возможно, что потеря положительного заряда влияет на ориентацию и положение N-концевого домена и на межсубъединичные контакты, образуемые этим доменом в структуре олигомеров малых белков теплового шока.

Описано несколько мутаций α A-кристаллина в собственно кристаллиновом домене (рис. 2, табл.). У больных, страдающих возрастной катарактой, обнаружена точечная мутация F71L [83]. Ранее при исследовании свойств α A-кристаллина крысы (гомологичного белку человека) было обнаружено, что мутация F71G не оказывает существенного влияния на вторичную, третичную или четвертичную структуру белка, но сопровождается увеличением гидрофобности и уменьшением шапероноподобной активности [84]. Позднее было установлено, что мутация F71L в α A-кристаллине человека не влияет на любой из уровней структурной организации белка, но заметно уменьшает его температурную устойчивость и способность защищать α B-кристаллин от тепловой денатурации и агрегации [85]. Описанные эффекты могут быть обусловлены тем, что указанная мутация затрагивает часть β 3 складки, в составе которой могут находиться участки связывания белков-мишеней.

Обнаружены корреляции с развитием врожденной катаракты и мутацией G98R [86, 87]. Указанная мутация расположена либо в конце β 5 складки, либо в начале петли, соединяющей складки β 5 и β 6– β 7. Высказывается предположение, что замена глицина на остаток аргинина может приводить к формированию короткой спирали и/или определенному упорядочиванию структуры в указанном положении кристаллинового домена [86], что может влиять на свойства α A-кристаллина. Кроме того, замена маленького по размеру остатка глицина на объемный остаток аргинина, вероятно, может влиять на ориентацию и взаимодействие консервативных остатков фенилаланина (F114), входящих в состав антипараллельных β 6– β 7 складок двух соседних мономеров α A-кристаллина [88].

В конце 90-х годов прошлого века была описана точечная мутация R116C α A-кристаллина [89], приводящая к аутосомно-доминантной врожденной катаракте. Позднее была выявлена другая мутация того же остатка (R116H), которая тоже сопровождается развитием врожденной катаракты [90]. Остаток R116 входит в состав складки $\beta 6$ – $\beta 7$, которая играет важную роль в межсубъединичных контактах двух соседних мономеров кристаллина [21, 22]. Более того, при выравнивании первичных структур нескольких малых белков теплового шока (рис. 2) очевидно, что именно это положение является «горячей точкой», подвергается мутированию в структурах HspB1, HspB4, HspB5 и HspB8, и мутирование этого остатка приводит к возникновению различных врожденных заболеваний. По этой причине в литературе есть много сведений о влиянии мутации именно этого остатка на структуру и свойства малых белков теплового шока. В ранних исследованиях было установлено, что мутация R116C влияет на вторичную, третичную и четвертичную структуру α A-кристаллина и уменьшает его шаперонную активность [91–93]. α A-Кристаллин с мутацией R116C с меньшей скоростью и эффективностью образует гомодимеры [93]. Одновременно с этим мутант R116C с большей скоростью образует гетероолигомеры с α B-кристаллином, чем белок дикого типа, однако заметно менее эффективен, чем белок дикого типа, в защите образовавшегося гетероолигомерного комплекса от тепловой денатурации [94]. Как и следовало ожидать, замена аргинина 116 на лизин сопровождается минимальными изменениями структуры и свойств, замена аргинина 116 на остаток цистеина или глицина приводит к большим изменениям, и, наконец, замена аргинина 116 на аспарагиновую кислоту приводит к максимальным изменениям свойств и значительному уменьшению шаперонной активности α A-кристаллина [95]. Нет сомнения в том, что мутации R116 приводят к очень значительным изменениям структуры и свойств α A-кристаллина, что может быть обусловлено изменением взаимодействия между соседними мономерами этого малого белка теплового шока, взаимодействующих между собой посредством $\beta 6$ – $\beta 7$ складки, в состав которой входит остаток R116. Мы рассмотрим этот процесс более подробно позднее при анализе структуры α B-кристаллина.

Совсем недавно была описана еще одна мутация, локализованная вблизи вышеупомянутой «горячей точки». Установлено, что делеция трех нуклеотидов приводит к точечной замене R117H и делеции Y118 [87]. Появление белка с точечной мутацией R117 и отсутствующим Y118 также сопровождается развитием врожденной катаракты.

Вероятной причиной этого явления также может быть нарушение межсубъединичных взаимодействий в олигомерах кристаллинов.

МУТАЦИИ α В-КРИСТАЛЛИНА (HSPB5)

В отличие от α A-кристаллина, экспрессируемого преимущественно в хрусталике, его гомолог α В-кристаллин экспрессируется повсеместно, практически во всех органах и тканях [6]. По этой причине мутации α В-кристаллина могут сопровождаться развитием различных врожденных заболеваний, таких как различные формы катаракты, миофибриллярная миопатия и/или кардиомиопатии. Некоторые мутации α В-кристаллина сопровождаются появлением симптомов, характерных сразу для нескольких заболеваний [96].

В общей сложности в настоящее время описано 15 мутаций локализованных в N-концевом, кристаллиновом или C-концевом доменах α В-кристаллина (рис. 2, табл.). Пять мутаций (R11H, P20S, Ser21Alafsx24, R56W, R69C) локализованы в варибельном N-концевом домене α В-кристаллина. Мутация R11H коррелирует с развитием аутосомно-доминантной врожденной ядерной катаракты [97]. Компьютерное моделирование свидетельствует о том, что указанная мутация может сопровождаться изменениями вторичной и третичной структуры, а также изменениями гидрофильности и электрического потенциала на поверхности белка. Высказывается предположение, что следствием этого может быть изменение термодинамической стабильности α В-кристаллина и/или изменение его растворимости и взаимодействия с белками-мишенями или белками-партнерами [97]. Точечная мутация P20S затрагивает консервативный остаток пролина и располагается в непосредственной близости от фосфорилируемого остатка Ser19 [98]. Вероятно, мутация, вызывающая развитие катаракты, может приводить к изменению степени фосфорилирования α В-кристаллина и/или влиять на его антиапоптотическую активность [99].

Необычная делеционная мутация была обнаружена у канадских абorigенов. В этом случае делеция c.60delC приводила к замене Ser21 на аланин, после которого следовали 24 аминокислотных остатка, отличных от первичной структуры интактного белка, и обрыв полипептидной цепи на 44 остатке [100]. У детей, гомозиготных по мутантному гену, развивалась тяжелая миофибриллярная миопатия и респираторная недостаточность, приводящая к смерти в возрасте от 1 до 3 лет [100]. Возможно, укороченная форма α В-кристаллина не способна связываться и стабилизировать титин и/или десмин, белки, обеспечивающие формирование цитоскелета мышц и участвующие в обеспечении эластичности мышцы. Вследствие этого в ходе механи-

ческих воздействий происходит повреждение и гибель мышечных волокон [100].

Аутосомно-рецессивная мутация R56W сопровождается возникновением ювенильной катаракты [101, 102]. Указанная мутация затрагивает участок, который может отвечать за взаимодействие α В-кристаллина с β _n- и γ D-кристаллинами, а также за межсубъединичные взаимодействия мономеров α -кристаллина [103]. Все это может приводить к развитию катаракты, форма и тяжесть которой значительно варьирует у разных пациентов.

Точечная мутация R69C расположена на границе между N-концевым и кристаллиновым доменами и может входить в состав β 2 складки кристаллинового домена (рис. 2). Эта точечная мутация сопровождается развитием аутосомно-доминантной формы катаракты [87]. Молекулярные механизмы возникновения катаракты в этом случае остаются невыясненными, однако можно предположить, что как и в случае α A-кристаллина, замена положительно заряженного остатка аргинина нейтральным остатком цистеина может влиять на распределение зарядов на поверхности белка. Кроме того, R69 располагается поблизости от участка α В-кристаллина, ограниченного остатками 73–85 и играющего важную роль во взаимодействии с белками-партнерами и белками-субстратами [27], что также может существенно изменять свойства мутантного белка.

Недавно описанная мутация D109N сопровождается развитием катаракты, дистальной миопатии, респираторной недостаточностью, дисфонией и дисартрией [96]. Столь тяжелые последствия этой мутации могут быть связаны с тем, что замена отрицательно заряженного остатка аспарагиновой кислоты положительно заряженным остатком гистидина нарушает солевой мостик, образуемый Asp109 одного мономера кристаллина с Arg120 соседнего мономера кристаллина [96] (рис. 3). Вероятно, следствием этого может быть существенное изменение структуры и свойств как изолированного мономера, так и гомо- или гетероолигомерных комплексов, образуемых α В-кристаллином.

Сравнительно недавно была описана мутация, приводящая к синтезу делеционного мутанта α В-кристаллина, обозначаемого как c.343delT [104]. Делеция одного нуклеотида приводит к замене Ser115 на пролин, за которым следуют 14 аминокислотных остатков, не характерных для первичной структуры α В-кристаллина, после чего следует обрыв полипептидной цепи. Вследствие этого вместо белка, состоящего из 175 остатков, синтезируется полипептид, состоящий из 127 остатков с молекулярной массой 14,7 кДа. У ребенка с указанной редкой рецессивной мутацией были выявлены тяжелые поражения,

характерные для так называемой миофибриллярной миопатии. Электронная микроскопия выявила значительные нарушения структуры миофибрилл и накопление фибриллярного материала и гранулам в различных мышцах. Высказано предположение, что указанный делеционный мутант не способен защищать белки сократительного аппарата и промежуточных филаментов от повреждений, возникающих при механической активности, вследствие чего развиваются тяжелые повреждения различных групп мышц [104], которые во многом схожи с такими же изменениями, зарегистрированными в случае мутации Ser21Alafsx21 [100].

Вероятно, наиболее подробно исследована мутация R120G. Исходно считалось, что эта мутация вызывает так называемую зависимую от десмина миопатию (desmin-related myopathy) [105]. Позднее было установлено, что эта мутация может сопровождаться развитием катаракты и кардиомиопатии [106]. Опыты, проведенные на изолированных белках, показали, что точечная мутация R120G сопровождается значительными изменениями вторичной, третичной и четвертичной структуры белка, уменьшением устойчивости к тепловой денатурации, а также значительным уменьшением шаперонной активности [91, 107, 108]. Указанный мутант обладал повышенным сродством к промежуточным филаментам, образованным десмином, и способствовал их агрегации [107]. Проведенное в условиях *in vitro* мутирование R120 и замена остатка аргинина на остатки глицина, цистеина, лизина или аспарагиновой кислоты позволило прийти к заключению, что R120 играет ключевую роль во взаимодействии мономеров α В-кристаллина и его мутирование приводит к драматическим изменениям в стабильности изолированного кристаллина и в его шаперонной активности [106, 109]. Структурные исследования последних лет полностью подтвердили это предположение. Как уже отмечалось, было установлено, что в димере изолированного кристаллинового домена α В-кристаллина R120 одного мономера взаимодействует с D109 соседнего мономера и два таких солевых мостика стабилизируют структуру димера, в составе которого формируется глубокая канавка между двумя антипараллельными β 6– β 7 складками, принадлежащими двум соседним мономерам [22, 88] (рис. 3). Аналогичные взаимодействия характерны и для остатков R116 и D105 в структуре димера изолированного кристаллинового домена α А-кристаллина [22]. Точечные мутации R120 или D109 приводят к разрушению пары солевых мостиков, стабилизирующих димер антипараллельных β 6– β 7 складок. В то же время становится возможным образование солевых мостиков между D80, находящимся

в $\beta 3$ одного мономера, с H83, находящимся в $\beta 3$ складке соседнего мономера [88, 110]. Две $\beta 3$ складки соседних мономеров образуют своеобразную «крышку» глубокой канавки между двумя анти-параллельными $\beta 6$ – $\beta 7$ складками, поэтому образование солевых мостиков между D80 и H83 приводит к «закрыванию» канавки и заметным структурным изменениям в олигомере кристаллина.

Аутосомно-доминантная мутация D140N сопряжена с возникновением врожденной ламеллярной катаракты [111]. Вторичная структура мутанта D140N практически не отличается от структуры белка дикого типа, в то же время мутантный белок отличается по третичной и четвертичной структуре от белка дикого типа и обладает более выраженными гидрофобными свойствами. Помимо этого мутантный белок имеет очень низкую температурную стабильность и очень низкую шаперонную активность, при этом добавление белка дикого типа не улучшает ни температурную стабильность, ни шаперонную активность D140N [111]. Высказывается предположение, что в составе белка дикого типа D140 участвует в образовании солевого мостика с H83, входящим в состав $\beta 3$ складки, и играющим, как это упоминалось выше, важную роль в стабилизации внутри- и межмономерных контактов в структуре α В-кристаллина [110].

Несколько описанных мутаций расположено в С-концевом домене α В-кристаллина (рис. 2, табл.). Делеционная мутация Q151X сопровождается преждевременным обрывом полипептидной цепи на 151 аминокислотном остатке и отсутствием остатков 152–175, имеющих в структуре белка дикого типа [112, 113]. Экспрессия мутантного белка Q151X приводит к развитию миофибриллярной миопатии. Установлено, что при экспрессии в клетке Q151X склонен к образованию агрегатов и обнаруживается в ядерной и цитоскелетной фракциях, что не характерно для белка дикого типа. Помимо этого степень фосфорилирования Q151X, экспрессируемого в клетке, выше, чем степень фосфорилирования белка дикого типа [114]. Все эти изменения могут быть следствием отсутствия в структуре Q151X С-концевого участка TIRIT (так называемого IXI мотива), играющего важную роль в образовании олигомеров малых белков теплового шока и в регуляции их взаимодействия с белками-мишенями [24].

Мутация G154S затрагивает участок, расположенный поблизости от консервативного IXI мотива в С-концевом участке α В-кристаллина [112, 115]. Эта мутация приводит либо к развитию дистальной миопатии с накоплением белковых агрегатов в мышечных клетках [115], либо к возникновению кардиомиопатии с субклиническими признаками дистальной миопатии [116].

Точечная мутация R157H была выявлена при анализе японских пациентов страдающих дилатационной кардиомиопатией [117]. Детальные молекулярные механизмы, лежащие в основе возникновения этой патологии, остаются неизвестными. Однако установлено, что мутация R157H ослабляет взаимодействие α В-кристаллина с N2B доменом, который имеется только в структуре изоформы титина сердца [117].

Точечная мутация A171T была выявлена у детей с ламеллярной катарактой [80]. В данном случае не удалось проследить детали наследования, однако авторы считают, что указанная доминантная мутация не является следствием генетического полиморфизма [80]. Физико-химические свойства белка с указанной мутацией не исследовались, однако можно предположить, что точечная мутация в С-концевом домене влияет либо на четвертичную структуру кристаллина, либо на его взаимодействие с белками-мишенями.

Помимо перечисленных точечных мутаций в С-концевом домене α В-кристаллина выявлены две делеционные мутации. Одна мутация, 450delA, приводит к сдвигу рамки считывания и синтезу мутантной формы α В-кристаллина, в которой последние 26 аминокислотных остатков белка дикого типа (начиная с R150) заменены на последовательность из 35 новых аминокислотных остатков, содержащих 6 остатков пролина [118]. Экспрессия мутантного α В-кристаллина сопровождается развитием аутосомно-доминантной катаракты. Вторая мутация 464delCT, сопровождающаяся делецией двух нуклеотидов, также приводит к сдвигу рамки считывания. Вследствие этого в мутантном белке аминокислотная последовательность после 154 остатка глицина полностью отличается от последовательности белка дикого типа и представлена в виде необычного 8-членного пептида RANNSHNP [113]. Эта мутация приводит к развитию миофибриллярной миопатии, приводящей к поражению мышц плечевого пояса (limb girdle) и респираторной недостаточности. Детальных исследований физико-химических свойств описываемых мутантных форм α В-кристаллина не проводилось. Однако установлено, что мутация 464delCT приводит к тому, что экспрессируемый в клетках белок склонен к агрегации, в большей степени (чем белок дикого типа) фосфорилирован и отличается от белка дикого типа по своей способности образовывать гомо- и гетероолигомеры [114]. В обоих анализируемых белках отсутствует расположенная в С-концевой области консервативная гидрофобная последовательность IXI, которая играет важную роль в образовании олигомеров α В-кристаллина. Кроме того, С-концевой участок этих

мутантных белков сильно изменен, что, вероятно, может влиять на взаимодействие с белками-мишенями и/или растворимость комплексов, образуемых мутантным α В-кристаллином с белками-мишенями.

МУТАЦИИ МАЛОГО БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА HSPB6 (HSP20)

Насколько нам известно, в настоящее время описана только одна мутация HspB6. При генетическом анализе кодирующей области гена *HspB6* у 1347 пациентов, страдающих дилатационной кардиомиопатией, и 744 здоровых людей была выявлена точечная мутация C59T. Эта мутация, выявленная в гетерозиготном виде у одного больного и трех здоровых людей, приводит к замене консервативного пролина в 20 положении на лейцин (P20L) [119]. Указанная мутация сопровождается изменением вторичной структуры белка и уменьшением эффективности его фосфорилирования по остатку Ser16, катализируемому циклонуклеотид-зависимыми протеинкиназами [119]. Известно, что HspB6 участвует в регуляции сокращения гладких мышц, обладает кардиопротекторной и антиапоптотической активностями, может участвовать в регуляции инсулин-зависимой регуляции метаболизма в гладких и поперечно-полосатых мышцах, а также может выступать в качестве потенциального регулятора агрегации тромбоцитов [3, 17, 120]. Многие из перечисленных свойств и в частности кардиопротекторная активность HspB6 зависят от его фосфорилирования по остатку Ser16 [3, 120–122]. По этой причине можно было ожидать, что уменьшение эффективности фосфорилирования, обнаруженное для мутантного белка P20L, будет сопровождаться уменьшением его кардиопротекторной активности. Действительно, оказалось, что при трансфекции в кардиомиоциты мутантная форма HspB6 оказалась заметно менее эффективной в защите клеток от модели ишемии/реперфузии, чем белок дикого типа [119]. Таким образом, редкая мутация P20L в структуре HspB6 может заметно уменьшать защитные свойства этого белка в клетках сердца.

МУТАЦИИ МАЛОГО БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА HSPB8 (HSP22)

В настоящее время описано две мутации (K141N и K141E), затрагивающие один и тот же остаток K141 в структуре HspB8 [123, 124]. Данные множественного выравнивания (рис. 2) свидетельствуют о том, что в указанном положении все малые белки теплового шока содержат положительно заряженные остатки аргинина или лизина и что именно данное положение является своеобразной «горячей точкой», мутации в которой приводят к возникновению различных

наследственных болезней. Оказалось, что точечные мутации K141N и K141E в структуре HspB8 коррелируют с развитием дистальной врожденной моторной невропатии и/или болезни Шарко-Мари-Ту II типа [123, 124].

При экспрессии в клетках обе мутантные формы HspB8 склонны к агрегации, при этом образующиеся агрегаты содержат в своем составе как мутантные формы HspB8, так и эндогенный HspB1 дикого типа [123]. Исследование физико-химических свойств показало, что мутация K141E приводит к некоторому разупорядочиванию структуры HspB8 и повышению его чувствительности к протеолизу [125]. Помимо этого оказалось, что мутации K141E и K137E сопровождаются уменьшением шаперонной активности HspB8 при использовании некоторых модельных белков-мишеней [125, 126]. Мутации K141E и K141N сопровождаются изменением взаимодействия HspB8 с другими малыми белками теплового шока (HspB1 и HspB5) [127]. Кроме того, мутации усиливают взаимодействие HspB8 с РНК-хеликазой Ddx20 (гемином 3), белком, который (вместе с белковыми партнерами) связывает микроРНК, участвующие в репрессии трансляции, а также напрямую взаимодействует с белком, отвечающим за выживание мотонейронов (survival-of-motor-neurons protein, SNM). Мутантные формы HspB8 обладают большим сродством к Ddx20, чем белок дикого типа, что может приводить как к изменению взаимодействия Ddx20 с SNM, так и к изменению связывания и защиты микроРНК [128]. В дополнение к этому следует заметить, что HspB8 взаимодействует с белком Bag3 [129]. Образующийся при этом комплекс HspB8–Bag3 стимулирует процесс автофагии и убиквитинилирования и таким образом обеспечивает удаление неправильно свернутых и частично денатурированных белков. Точечная мутация K141E ослабляет взаимодействие HspB8 с Bag3 [130]. Кроме того, на клеточном уровне установлено, что HspB8 дикого типа стимулирует автофагию неправильно свернутых белков в сходных с мотонейронами NCS34 клетках, а мутантная форма K141N не способна стимулировать автофагию [131]. Таким образом, мутации могут существенно ослаблять защитное действие HspB8. Наконец, недавно проведенные исследования, выполненные на фибробластах кожи людей, страдающих врожденной дистальной моторной невропатией, показали, что на ранних пассажах в клетках больных наблюдались агрегаты HspB8, которые отсутствовали в клетках здоровых людей. Кроме того, в клетках больных наблюдалось заметное уменьшение мембранного потенциала митохондрий, а тепловой шок сопровождался накоплением крупных агрегатов мутантного HspB8 [132]. Спустя 3 месяца культивирования фибробластов различия между

клетками больных и здоровых людей практически полностью исчезли. Этот факт может свидетельствовать о том, что эффект точечных мутаций HspB8 может зависеть от состояния клеток, степени их дифференцировки и/или типа ткани, из которой были отобраны клетки. Для проверки этого предположения мутантные формы HspB8 экспрессировали в первичной культуре нейрональных и глиальных клеток [133]. Оказалось, что экспрессия мутантных форм HspB8 в мотонейронах сопровождалась уменьшением количества и длины нейритов. В сенсорных или кортикальных нейронах экспрессия мутантных форм HspB8 не вызывала никаких изменений или сопровождалась только очень незначительными изменениями морфологии [133]. Эти данные хорошо согласуются с тем фактом, что мутации HspB8 приводят в первую очередь к повреждению мотонейронов и не влияют (или слабо влияют) на сенсорные нейроны.

Молекулярные механизмы, лежащие в основе описанных патологических изменений, остаются не вполне понятными. Тем не менее, следует отметить, что точечная мутация K141 в структуре HspB8 аналогична по своей природе рассмотренным выше мутациям R140 в структуре HspB1, R116 в структуре α A-кристаллина (HspB4) и R120 в структуре α B-кристаллина (HspB5). Во всех этих случаях положительно заряженный остаток аргинина (или лизина) образует солевой мостик с остатком аспарагиновой кислоты, расположенным в соседнем мономере за 11 остатков от указанной «горячей точки» (Asp129 в структуре HspB1, Asp105 в структуре HspB4 и Asp109 в структуре HspB5) (рис. 4). Этот солевой мостик стабилизирует межсубъединичные контакты указанных малых белков теплового шока [21, 88]. Образование аналогичного солевого мостика между остатками R119 и D108 возможно и в случае HspB6 (рис. 4). В HspB8 дикого типа на месте консервативного остатка аспарагиновой кислоты находится остаток глутамина (Q130), что ослабляет межсубъединичные контакты (рис. 4). Очевидно, что точечные мутации K141E и K141N в еще большей степени ослабляют межсубъединичные контакты HspB8. Как уже отмечалось, в случае точечной мутации R116 в структуре HspB4 или в случае точечной мутации R120 в структуре HspB5 структура димеров стабилизируется за счет формирования новых солевых связей, образованных D76 и H79 в составе HspB4 или D80 и H83 в составе HspB5. В составе HspB8 гомологичные положения заняты остатками аспарагина и серина, что делает невозможным образование солевого мостика и приводит к еще большей дестабилизации структуры димера. Вероятно, именно вследствие этого мутация K141E приводит к резкому увеличению скорости протеолитической деградации HspB8 [125, 126].

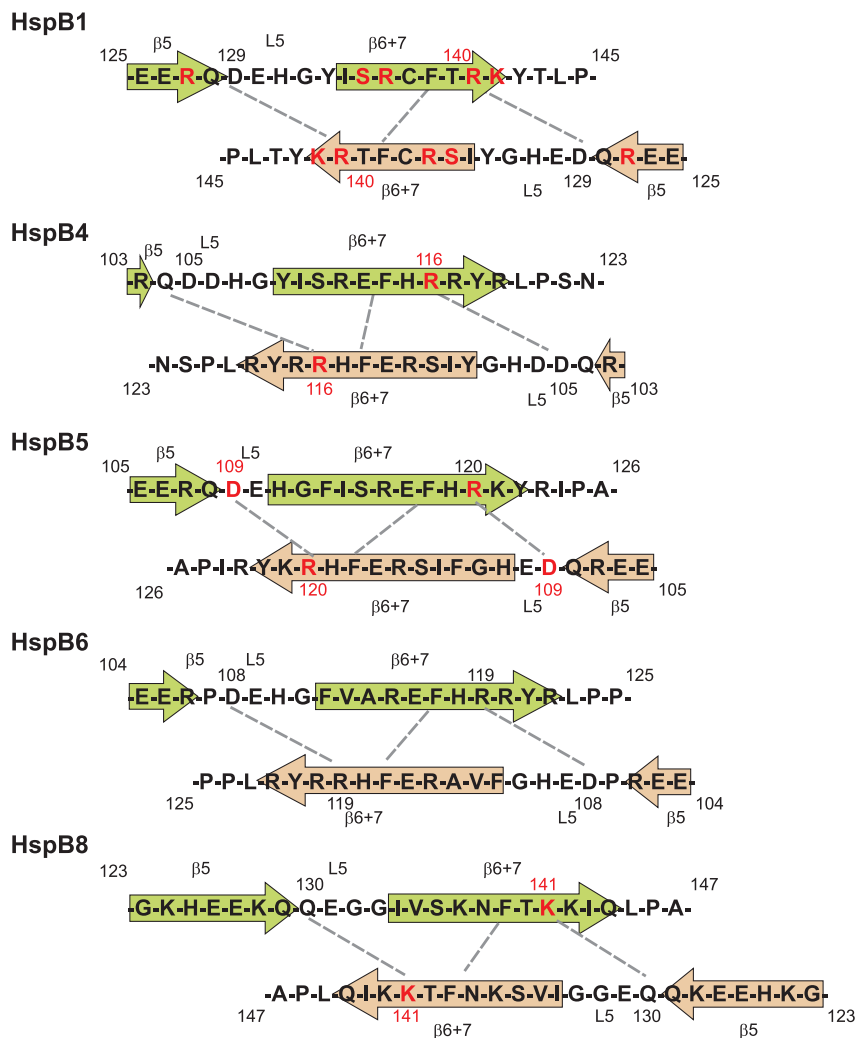


Рис. 4. Линейная схема расположения двух антипараллельных $\beta 6$ – $\beta 7$ складок в области межсубъединичных контактов пяти малых белков теплового шока человека.

Положение $\beta 5$ и $\beta 6$ – $\beta 7$ складок и петли, соединяющей эти складки (L5), указаны с использованием программы PsiPred v3.0 (для HspB1, HspB6 и HspB8) или по данным рентгеноструктурного анализа кристаллинового домена HspB4 [22] или ядерного магнитного резонанса HspB5 [136]. Пунктирами обозначено положение солевых мостиков между остатками Arg и Asp (или водородные связи между остатками Lys и Gln в случае HspB8) и гидрофобных взаимодействий между консервативными остатками фенилаланина. Красным обозначены остатки, мутации которых описаны в литературе.

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Малые белки теплового шока экспрессируются практически во всех органах и тканях и играют важную роль в поддержании нормальной жизнеспособности клеток. В силу того, что малые белки теплового шока участвуют в регуляции многочисленных процессов, протекающих в клетке, мутации этих белков приводят к возникновению различных наследственных заболеваний, таких как различные формы миопатий, кардиомиопатий, нейродегенеративных заболеваний и катаракты (табл.). В настоящее время описано большое количество мутаций HspB1, HspB4 и HspB5, а также выявлены мутации HspB3, HspB6 и HspB8 (табл.). Исследование структуры и свойств большинства обнаруженных мутантов находится в самом начальном состоянии и поэтому пока что трудно дать четкое молекулярно-биологическое описание процессов, лежащих в основе возникновения тех или иных патологических процессов. В литературе высказывается несколько предположений о том, почему мутации малых белков теплового шока могут приводить к возникновению ряда врожденных заболеваний [7, 134]. Во-первых, малые белки теплового шока способны взаимодействовать между собой и образовывать гетероолигомерные комплексы. По этой причине мутантные формы малых белков теплового шока могут связывать и выводить из строя значительные количества немутированных малых белков теплового шока дикого типа. Во-вторых, как уже отмечалось, некоторые малые белки теплового шока (такие как HspB1 и HspB8) могут участвовать в регуляции процессов протеолитической деградации неправильно свернутых белков. Например, HspB1 может участвовать в регуляции протеасомной деградации белков [3], а HspB8 может быть вовлечен в регуляцию процессов автофагии [135] и протеасомной деградации денатурированных белков. Мутации малых белков теплового шока могут предотвращать или замедлять процесс деградации денатурированных белков. В-третьих, мутации могут приводить к изменению специфичности малых белков теплового шока и к тому, что мутированные белки по-иному взаимодействуют со своими белками-мишенями. Например, как отмечалось выше, мутации малых белков теплового шока могут сопровождаться дестабилизацией цитоскелета (микротрубочек, промежуточных филаментов, микрофиламентов), следствием чего может быть развитие различных патологических процессов. Кроме того, мутированные белки, как правило, обладают пониженной шаперонной активностью, что может приводить к накоплению в клетках денатурированных и агрегированных белков и амилоидов. В-четвертых, мутации малых белков теплового шока

могут приводить к уменьшению их антиапоптотической активности и ослаблению их защитного влияния при окислительном стрессе и накоплении активных форм кислорода. Уже сейчас предпринимаются попытки разработать рекомендации по лечению врожденных заболеваний, связанных с мутациями малых белков теплового шока (например, так называемых кристаллинопатий) [134]. Нам кажется, что для решения этой большой и сложной проблемы необходимо провести целый ряд предварительных исследований. Во-первых, необходимо подробно исследовать структуру и свойства мутантных форм малых белков теплового шока. Во-вторых, проанализировать взаимодействие различных мутантных форм и белков дикого типа между собой. В-третьих, сопоставить шаперонную активность белков дикого типа и их мутантных форм с различными белками-субстратами. В-четвертых, попытаться получить ответ на вопрос, почему для мутаций малых белков теплового шока характерна тканевая специфичность и почему разные мутации одного и того же белка приводят к возникновению различных врожденных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kriehuber, T., Rattei, T., Weinmaier, T., Bepperling, A., Haslbeck, M., and Buchner, J. (2010) *FASEB J.*, **24**, 3633–3642.
2. Basha, E., O'Neill, H., and Vierling, E. (2012) *Trends Biochem. Sci.*, **37**, 106–117.
3. Mymrikov, E.V., Seit-Nebi, A.S., and Gusev, N.B. (2011) *Physiol. Rev.*, **91**, 1123–1159.
4. Kappe, G., Boelens, W.C., and de Jong, W.W. (2010) *Cell Stress Chaperones*, **15**, 457–461.
5. Vos, M.J., Hageman, J., Carra, S., and Kampinga, H.H. (2008) *Biochemistry*, **47**, 7001–7011.
6. Taylor, R.P. and Benjamin, I.J. (2005) *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **38**, 433–444.
7. Carra, S., Crippa, V., Rusmini, P., Boncoraglio, A., Minoia, M., Giorgetti, E., Kampinga, H.H., and Poletti, A. (2012) *Prog. Neurobiol.*, **97**, 83–100.
8. Vos, M.J., Zijlstra, M.P., Carra, S., Sibon, O.C., and Kampinga, H.H. (2011) *Autophagy*, **7**, 101–103.
9. McHaourab, H.S., Godar, J.A., and Stewart, P.L. (2009) *Biochemistry*, **48**, 3828–3837.
10. Boncoraglio, A., Minoia, M., and Carra, S. (2012) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, doi.10.1016/j.biocel.2012.03.011.
11. Carra, S., Brunsting, J.F., Lambert, H., Landry, J., and Kampinga, H.H. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 5523–5532.
12. Jego, G., Hazoume, A., Seigneuric, R., and Garrido, C. (2010) *Cancer Lett.*, doi.10.1016/j.canlet.2010.10.014.
13. Acunzo, J., Katsogiannou, M., and Rocchi, P. (2012) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, doi.10.1016/j.biocel.2012.04.002.
14. Arrigo, A.P. (2007) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **594**, 14–26.
15. Mounier, N. and Arrigo, A.P. (2002) *Cell Stress Chaperones*, **7**, 167–176.
16. Dreiza, C.M., Komalavilas, P., Furnish, E.J., Flynn, C.R., Sheller, M.R., Smoke, C.C., Lopes, L.B., and Brophy, C.M. (2010) *Cell Stress Chaperones*, **15**, 1–11.

17. Edwards, H.V., Cameron, R.T., and Baillie, G.S. (2011) *Cell. Signal.*, **23**, 1447–1454.
18. Sun, Y. and MacRae, T.H. (2005) *FEBS J.*, **272**, 2613–2627.
19. Benndorf, R. and Welsh, M.J. (2004) *Nat. Genet.*, **36**, 547–548.
20. Laskowska, E., Matuszewska, E., and Kuczynska-Wisnik, D. (2010) *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **11**, 146–157.
21. Bagneris, C., Bateman, O.A., Naylor, C.E., Cronin, N., Boelens, W.C., Keep, N.H., and Slingsby, C. (2009) *J. Mol. Biol.*, **392**, 1242–1252.
22. Laganowsky, A., Benesch, J.L., Landau, M., Ding, L., Sawaya, M.R., Cascio, D., Huang, Q., Robinson, C.V., Horwitz, J., and Eisenberg, D. (2010) *Protein Sci.*, **19**, 1031–1043.
23. Baranova, E.V., Weeks, S.D., Beelen, S., Bukach, O.V., Gusev, N.B., and Strelkov, S.V. (2011) *J. Mol. Biol.*, **411**, 110–122.
24. Hilton, G.R., Lioe, H., Stengel, F., Baldwin, A.J., and Benesch, J.L. (2012) *Top. Curr. Chem.*, doi: 10.1007/128_2012_324.
25. Baldwin, A.J., Lioe, H., Robinson, C.V., Kay, L.E., and Benesch, J.L. (2011) *J. Mol. Biol.*, **413**, 297–309.
26. Ecroyd, H., Meehan, S., Horwitz, J., Aquilina, J.A., Benesch, J.L., Robinson, C.V., Macphree, C.E., and Carver, J.A. (2007) *Biochem. J.*, **401**, 129–141.
27. Ghosh, J.G., Estrada, M.R., Houck, S.A., and Clark, J.I. (2006) *Cell Stress Chaperones*, **11**, 187–197.
28. Ghosh, J.G., Shenoy, A.K., Jr., and Clark, J.I. (2007) *Biochemistry*, **46**, 6308–6317.
29. Sreelakshmi, Y., Santhoshkumar, P., Bhattacharyya, J., and Sharma, K.K. (2004) *Biochemistry*, **43**, 15785–15795.
30. Sreelakshmi, Y. and Sharma, K.K. (2005) *Biochemistry*, **44**, 12245–12252.
31. Houck, S.A. and Clark, J.I. (2010) *PLoS ONE*, **5**, e11795.
32. van Montfort, R.L., Basha, E., Friedrich, K.L., Slingsby, C., and Vierling, E. (2001) *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 1025–1030.
33. Stamler, R., Kappe, G., Boelens, W., and Slingsby, C. (2005) *J. Mol. Biol.*, **353**, 68–79.
34. Kim, K.K., Kim, R., and Kim, S.H. (1998) *Nature*, **394**, 595–599.
35. Jehle, S., Vollmar, B.S., Bardiaux, B., Dove, K.K., Rajagopal, P., Gonen, T., Oschkinat, H., and Klevit, R.E. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 6409–6414.
36. Lambert, H., Charette, S.J., Bernier, A.F., Guimond, A., and Landry, J. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 9378–9385.
37. Theriault, J.R., Lambert, H., Chavez-Zobel, A.T., Charest, G., Lavigne, P., and Landry, J. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 23463–23471.
38. Bova, M.P., McHaourab, H.S., Han, Y., and Fung, B.K. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 1035–1042.
39. Kostenko, S. and Moens, U. (2009) *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 3289–3307.
40. Villen, J., Beausoleil, S.A., Gerber, S.A., and Gygi, S.P. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 1488–1493.
41. Cantin, G.T., Yi, W., Lu, B., Park, S.K., Xu, T., Lee, J.D., and Yates, J.R., 3rd. (2008) *J. Proteome Res.*, **7**, 1346–1351.
42. Lelj-Garolla, B. and Mauk, A.G. (2005) *J. Mol. Biol.*, **345**, 631–642.
43. Aquilina, J.A., Benesch, J.L., Ding, L.L., Yaron, O., Horwitz, J., and Robinson, C.V. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 28675–28680.
44. Shemetov, A.A., Seit-Nebi, A.S., and Gusev, N.B. (2011) *Mol. Cell. Biochem.*, **355**, 47–55.
45. Ghosh, J.G., Houck, S.A., and Clark, J.I. (2007) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39**, 1804–1815.
46. Jaya, N., Garcia, V., and Vierling, E. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 15604–15609.
47. Lindner, R.A., Carver, J.A., Ehrnsperger, M., Buchner, J., Esposito, G.,

- Behlke, J., Lutsch, G., Kotlyarov, A., and Gaestel, M. (2000) *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1923–1932.
48. Treweek, T.M., Rekas, A., Walker, M.J., and Carver, J.A. (2010) *Exp. Eye Res.*, **91**, 691–699.
49. Kumarasamy, A. and Abraham, E.C. (2008) *PLoS ONE*, **3**, e3175.
50. Aquilina, J.A. and Watt, S.J. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **353**, 1115–1120.
51. Hanazono, Y., Takeda, K., Yohda, M., and Miki, K. (2012) *J. Mol. Biol.*, doi:10.1016/j.jmb.2012.05.017.
52. Baldwin, A.J., Hilton, G.R., Lioe, H., Bagneris, C., Benesch, J.L., and Kay, L.E. (2011) *J. Mol. Biol.*, **413**, 310–320.
53. Jiao, W., Qian, M., Li, P., Zhao, L., and Chang, Z. (2005) *J. Mol. Biol.*, **347**, 871–884.
54. Studer, S., Obrist, M., Lentze, N., and Narberhaus, F. (2002) *Eur. J. Biochem.*, **269**, 3578–3586.
55. Smulders, R., Carver, J.A., Lindner, R.A., van Boekel, M.A., Bloemendal, H., and de Jong, W.W. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 29060–29066.
56. Morris, A.M., Treweek, T.M., Aquilina, J.A., Carver, J.A., and Walker, M.J. (2008) *FEBS J.*, **275**, 5885–5898.
57. Houlden, H., Laura, M., Wavrant-De Vrieze, F., Blake, J., Wood, N., and Reilly, M.M. (2008) *Neurology*, **71**, 1660–1668.
58. Gentil, B.J. and Cooper, L. (2012) *Brain Res. Bull.*, **88**, 444–453.
59. James, P.A., Rankin, J., and Talbot, K. (2008) *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **79**, 461–463.
60. Capponi, S., Geroldi, A., Fossa, P., Grandis, M., Ciotti, P., Gulli, R., Schenone, A., Mandich, P., and Bellone, E. (2011) *J. Peripher. Nerv. Syst.*, **16**, 287–294.
61. Evgrafov, O.V., Mersyanova, I., Irobi, J., Van Den Bosch, L., Dierick, I., Leung, C.L., Schagina, O., Verpoorten, N., Van Impe, K., Fedotov, V., Dadali, E., Auer-Grumbach, M., Windpassinger, C., Wagner, K., Mitrovic, Z., Hilton-Jones, D., Talbot, K., Martin, J.J., Vasserman, N., Tverskaya, S., Polyakov, A., Liem, R.K., Gettemans, J., Robberecht, W., De Jonghe, P., and Timmerman, V. (2004) *Nat. Genet.*, **36**, 602–606.
62. Dierick, I., Baets, J., Irobi, J., Jacobs, A., De Vriendt, E., Deconinck, T., Merlini, L., Van den Bergh, P., Rasic, V.M., Robberecht, W., Fischer, D., Morales, R.J., Mitrovic, Z., Seeman, P., Mazanec, R., Kochanski, A., Jordanova, A., Auer-Grumbach, M., Helderma-van den Enden, A.T., Wokke, J.H., Nelis, E., De Jonghe, P., and Timmerman, V. (2008) *Brain*, **131**, 1217–1227.
63. Almeida-Souza, L., Goethals, S., de Winter, V., Dierick, I., Gallardo, R., Van Durme, J., Irobi, J., Gettemans, J., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Timmerman, V., and Janssens, S. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 12778–12786.
64. Almeida-Souza, L., Asselbergh, B., d'Ydewalle, C., Moonens, K., Goethals, S., de Winter, V., Azmi, A., Irobi, J., Timmermans, J.P., Gevaert, K., Remaut, H., Van Den Bosch, L., Timmerman, V., and Janssens, S. (2011) *J. Neurosci.*, **31**, 15320–15328.
65. Almeida-Souza, L., Timmerman, V., and Janssens, S. (2011) *Bioarchitecture*, **1**, 267–270.
66. Srivastava, A.K., Renusch, S.R., Naiman, N.E., Gu, S., Sneh, A., Arnold, W.D., Sahenk, Z., and Kolb, S.J. (2012) *Neurobiol. Dis.*, **47**, 163–173.
67. d'Ydewalle, C., Krishnan, J., Chiheb, D.M., Van Damme, P., Irobi, J., Kozi-kowski, A.P., Vanden Berghe, P., Timmerman, V., Robberecht, W., and Van Den Bosch, L. (2011) *Nat. Med.*, **17**, 968–974.
68. Ikeda, Y., Abe, A., Ishida, C., Takahashi, K., Hayasaka, K., and Yamada, M. (2009) *J. Neurol. Sci.*, **277**, 9–12.
69. Lin, K.P., Soong, B.W., Yang, C.C., Huang, L.W., Chang, M.H., Lee, I.H., Antonellis, A., and Lee, Y.C. (2011) *PLoS ONE*, **6**, e29393.

70. Luigetti, M., Fabrizi, G.M., Madia, F., Ferrarini, M., Conte, A., Del Grande, A., Tasca, G., Tonali, P.A., and Sabatelli, M. (2010) *J. Neurol. Sci.*, **298**, 114–117.
71. Ackerley, S., James, P.A., Kalli, A., French, S., Davies, K.E., and Talbot, K. (2006) *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 347–354.
72. Kijima, K., Numakura, C., Goto, T., Takahashi, T., Otagiri, T., Umetsu, K., and Hayasaka, K. (2005) *J. Hum. Genet.*, **50**, 473–476.
73. Mandich, P., Grandis, M., Varese, A., Geroldi, A., Acquaviva, M., Ciotti, P., Gulli, R., Doria-Lamba, L., Fabrizi, G.M., Giribaldi, G., Pizzuti, A., Schenone, A., and Bellone, E. (2010) *J. Child Neurol.*, **25**, 107–109.
74. Rossor, A.M., Davidson, G.L., Blake, J., Polke, J.M., Murphy, S.M., Houlden, H., Innes, A., Kalmar, B., Green-smith, L., and Reilly, M.M. (2012) *J. Peripher. Nerv. Syst.*, **17**, 201–205.
75. Kolb, S.J., Snyder, P.J., Poi, E.J., Renard, E.A., Bartlett, A., Gu, S., Sutton, S., Arnold, W.D., Freimer, M.L., Lawson, V.H., Kissel, J.T., and Prior, T.W. (2010) *Neurology*, **74**, 502–506.
76. Asthana, A., Raman, B., Ramakrishna, T., and Rao, C.M. (2012) *Cell Biochem. Biophys.*,
77. Moreau, K.L. and King, J.A. (2012) *Trends Mol. Med.*, **18**, 273–282.
78. Pras, E., Frydman, M., Levy-Nissenbaum, E., Bakhan, T., Raz, J., Assia, E.I., and Goldman, B. (2000) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, 3511–3515.
79. Hansen, L., Yao, W., Eiberg, H., Kjaer, K.W., Baggesen, K., Hejtmancik, J.F., and Rosenberg, T. (2007) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **48**, 3937–3944.
80. Devi, R.R., Yao, W., Vijayalakshmi, P., Sergeev, Y.V., Sundaresan, P., and Hejtmancik, J.F. (2008) *Mol. Vis.*, **14**, 1157–1170.
81. Graw, J., Klopp, N., Illig, T., Preising, M.N., and Lorenz, B. (2006) *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **244**, 912–919.
82. Mackay, D.S., Andley, U.P., and Shiels, A. (2003) *Eur. J. Hum. Genet.*, **11**, 784–793.
83. Bhagyalaxmi, S.G., Srinivas, P., Barton, K.A., Kumar, K.R., Vidyavathi, M., Petrash, J.M., Bhanuprakash Reddy, G., and Padma, T. (2009) *Biochim. Biophys. Acta.* **1792**, 974–981.
84. Santhoshkumar, P. and Sharma, K.K. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 47094–47099.
85. Validandi, V., Reddy, V.S., Srinivas, P.N., Mueller, N.H., Bhagyalaxmi, S.G., Padma, T., Petrash, J.M., and Reddy, G.B. (2011) *FEBS Lett.*, **585**, 3884–3889.
86. Santhiya, S.T., Soker, T., Klopp, N., Illig, T., Prakash, M.V., Selvaraj, B., Gopinath, P.M., and Graw, J. (2006) *Mol. Vis.*, **12**, 768–773.
87. Sun, W., Xiao, X., Li, S., Guo, X., and Zhang, Q. (2011) *Mol. Vis.*, **17**, 2197–2206.
88. Clark, A.R., Naylor, C.E., Bagneris, C., Keep, N.H., and Slingsby, C. (2011) *J. Mol. Biol.*, **408**, 118–134.
89. Litt, M., Kramer, P., LaMorticella, D.M., Murphey, W., Lovrien, E.W., and Weleber, R.G. (1998) *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 471–474.
90. Gu, F., Luo, W., Li, X., Wang, Z., Lu, S., Zhang, M., Zhao, B., Zhu, S., Feng, S., Yan, Y.B., Huang, S., and Ma, X. (2008) *Hum. Mutat.*, **29**, 769.
91. Kumar, L.V., Ramakrishna, T., and Rao, C.M. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 24137–24141.
92. Shroff, N.P., Cherian-Shaw, M., Bera, S., and Abraham, E.C. (2000) *Biochemistry*, **39**, 1420–1426.
93. Cobb, B.A. and Petrash, J.M. (2000) *Biochemistry*, **39**, 15791–15798.
94. Bera, S. and Abraham, E.C. (2002) *Biochemistry*, **41**, 297–305.
95. Bera, S., Thampi, P., Cho, W.J., and Abraham, E.C. (2002) *Biochemistry*, **41**, 12421–12426.

96. Sacconi, S., Feasson, L., Antoine, J.C., Pecheux, C., Bernard, R., Cobo, A.M., Casarin, A., Salviati, L., Desnuelle, C., and Urtizberea, A. (2012) *Neuromuscul. Disord.*, **22**, 66–72.
97. Chen, Q., Ma, J., Yan, M., Mothobi, M.E., Liu, Y., and Zheng, F. (2009) *Mol. Vis.*, **15**, 1359–1365.
98. Li, H., Li, C., Lu, Q., Su, T., Ke, T., Li, D.W., Yuan, M., Liu, J., Ren, X., Zhang, Z., Zeng, S., Wang, Q.K., and Liu, M. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, **1782**, 303–309.
99. Liu, M., Ke, T., Wang, Z., Yang, Q., Chang, W., Jiang, F., Tang, Z., Li, H., Ren, X., Wang, X., Wang, T., Li, Q., Yang, J., Liu, J., and Wang, Q.K. (2006) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **47**, 3461–3466.
100. Del Bigio, M.R., Chudley, A.E., Sarnat, H.B., Campbell, C., Goobie, S., Chodirker, B.N., and Selcen, D. (2011) *Ann. Neurol.*, **69**, 866–871.
101. Khan, A.O., Abu Safieh, L., and Alkuraya, F.S. (2010) *Ophthalmic Genet.*, **31**, 30–36.
102. Safieh, L.A., Khan, A.O., and Alkuraya, F.S. (2009) *Mol. Vis.*, **15**, 980–984.
103. Ghosh, J.G., Estrada, M.R., and Clark, J.I. (2005) *Biochemistry*, **44**, 14854–14869.
104. Forrest, K.M., Al-Sarraj, S., Sewry, C., Buk, S., Tan, S.V., Pitt, M., Durward, A., McDougall, M., Irving, M., Hanna, M.G., Matthews, E., Sarkozy, A., Hudson, J., Barresi, R., Bushby, K., Jungbluth, H., and Wraige, E. (2011) *Neuromuscul. Disord.*, **21**, 37–40.
105. Vicart, P., Caron, A., Guicheney, P., Li, Z., Prevost, M.C., Faure, A., Chateau, D., Chapon, F., Tome, F., Dupret, J.M., Paulin, D., and Fardeau, M. (1998) *Nat. Genet.*, **20**, 92–95.
106. Simon, S., Michiel, M., Skouri-Panet, F., Lechaire, J.P., Vicart, P., and Tardieu, A. (2007) *Biochemistry*, **46**, 9605–9614.
107. Perng, M.D., Muchowski, P.J., van Den, I.P., Wu, G.J., Hutcheson, A.M., Clark, J.I., and Quinlan, R.A. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 33235–33243.
108. Bova, M.P., Yaron, O., Huang, Q., Ding, L., Haley, D.A., Stewart, P.L., and Horwitz, J. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6137–6142.
109. Michiel, M., Skouri-Panet, F., Duprat, E., Simon, S., Ferard, C., Tardieu, A., and Finet, S. (2009) *Biochemistry*, **48**, 442–453.
110. Clark, A.R., Lubsen, N.H., and Slingsby, C. (2012) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, doi:10.1016/j.biocel.2012.02.015.
111. Liu, Y., Zhang, X., Luo, L., Wu, M., Zeng, R., Cheng, G., Hu, B., Liu, B., Liang, J.J., and Shang, F. (2006) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **47**, 1069–1075.
112. Selcen, D. (2011) *Neuromuscul. Disord.*, **21**, 161–171.
113. Selcen, D. and Engel, A.G. (2003) *Ann. Neurol.*, **54**, 804–810.
114. Simon, S., Fontaine, J.M., Martin, J.L., Sun, X., Hoppe, A.D., Welsh, M.J., Benndorf, R., and Vicart, P. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 34276–34287.
115. Reilich, P., Schoser, B., Schramm, N., Krause, S., Schessl, J., Kress, W., Muller-Hocker, J., Walter, M.C., and Lochmuller, H. (2010) *Neuromuscul. Disord.*, **20**, 255–259.
116. Pilotto, A., Marziliano, N., Pasotti, M., Grasso, M., Costante, A.M., and Arbustini, E. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **346**, 1115–1117.
117. Inagaki, N., Hayashi, T., Arimura, T., Koga, Y., Takahashi, M., Shibata, H., Teraoka, K., Chikamori, T., Yamashina, A., and Kimura, A. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **342**, 379–386.
118. Berry, V., Francis, P., Reddy, M.A., Collyer, D., Vithana, E., MacKay, I., Dawson, G., Carey, A.H., Moore,

- A., Bhattacharya, S.S., and Quinlan, R.A.* (2001) *Am. J. Hum. Genet.*, **69**, 1141–1145.
119. *Nicolaou, P., Knoll, R., Haghghi, K., Fan, G.C., Dorn, G.W., 2nd, Hasenfub, G., and Kranias, E.G.* (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 33465–33471.
120. *Fan, G.C. and Kranias, E.G.* (2011) *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **51**, 574–577.
121. *Edwards, H.V., Scott, J.D., and Baillie, G.S.* (2012) *Biochem. Soc. Trans.*, **40**, 210–214.
122. *Edwards, H.V., Scott, J.D., and Baillie, G.S.* (2012) *Biochem. J.*, doi.10.1042/BJ20120570.
123. *Irobi, J., Van Impe, K., Seeman, P., Jordanova, A., Dierick, I., Verpoorten, N., Michalik, A., De Vriendt, E., Jacobs, A., Van Gerwen, V., Vennekens, K., Mazanec, R., Tournev, I., Hilton-Jones, D., Talbot, K., Kremensky, I., Van Den Bosch, L., Robberecht, W., Van Vandeckerckhove, J., Van Broeckhoven, C., Gettemans, J., De Jonghe, P., and Timmerman, V.* (2004) *Nat. Genet.*, **36**, 597–601.
124. *Tang, B.S., Zhao, G.H., Luo, W., Xia, K., Cai, F., Pan, Q., Zhang, R.X., Zhang, F.F., Liu, X.M., Chen, B., Zhang, C., Shen, L., Jiang, H., Long, Z.G., and Dai, H.P.* (2005) *Hum. Genet.*, **116**, 222–224.
125. *Kim, M.V., Kasakov, A.S., Seit-Nebi, A.S., Marston, S.B., and Gusev, N.B.* (2006) *Arch. Biochem. Biophys.*, **454**, 32–41.
126. *Kasakov, A.S., Bukach, O.V., Seit-Nebi, A.S., Marston, S.B., and Gusev, N.B.* (2007) *FEBS J.*, **274**, 5628–5642.
127. *Fontaine, J.M., Sun, X., Hoppe, A.D., Simon, S., Vicart, P., Welsh, M.J., and Benndorf, R.* (2006) *FASEB J.*, **20**, 2168–2170.
128. *Sun, X., Fontaine, J.M., Hoppe, A.D., Carra, S., DeGuzman, C., Martin, J.L., Simon, S., Vicart, P., Welsh, M.J., Landry, J., and Benndorf, R.* (2010) *Cell Stress Chaperones*, **15**, 567–582.
129. *Fuchs, M., Poirier, D.J., Seguin, S.J., Lambert, H., Carra, S., Charette, S.J., and Landry, J.* (2010) *Biochem. J.*, **425**, 245–255.
130. *Shemetov, A.A. and Gusev, N.B.* (2011) *Arch. Biochem. Biophys.*, **513**, 1–9.
131. *Kwok, A.S., Phadwal, K., Turner, B.J., Oliver, P.L., Raw, A., Simon, A.K., Talbot, K., and Agashe, V.R.* (2011) *J. Neurochem.*, **119**, 1155–1161.
132. *Irobi, J., Holmgren, A., Winter, V.D., Asselbergh, B., Gettemans, J., Adriaensen, D., Groote, C.C., Coster, R.V., Jonghe, P.D., and Timmerman, V.* (2012) *Neuromuscul. Disord.*, doi.10.1016/j.nmd.2012.04.005.
133. *Irobi, J., Almeida-Souza, L., Asselbergh, B., De Winter, V., Goethals, S., Dierick, I., Krishnan, J., Timmermans, J.P., Robberecht, W., De Jonghe, P., Van Den Bosch, L., Janssens, S., and Timmerman, V.* (2010) *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 3254–3265.
134. *Sanbe, A.* (2011) *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 1653–1658.
135. *Carra, S., Seguin, S.J., and Landry, J.* (2008) *Autophagy*, **4**, 237–239.
136. *Braun, N., Zacharias, M., Peschek, J., Kastenmuller, A., Zou, J., Hanzlik, M., Haslbeck, M., Rappsilber, J., Buchner, J., and Weinkauff, S.* (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 20491–20496.