

## МАЛЫЕ БЕЛКИ ТЕПЛОВОГО ШОКА И ВРОЖДЕННАЯ ДИСТАЛЬНАЯ НЕВРОПАТИЯ

©2015 г. В. В. НЕФЁДОВА\*, Л. К. МУРАНОВА\*,  
М. В. СУДНИЦЫНА, А.С. РЫЖАВСКАЯ  
Н. Б. ГУСЕВ

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

I. Введение. II. Врожденная дистальная невропатия. III. Мутации малого белка теплового шока HspB1 и врожденная дистальная невропатия. IV. Мутации малого белка теплового шока HspB3 и аксональная невропатия. V. Мутация малого белка теплового шока HspB8 и невропатии человека. VI. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Малые белки теплового шока (small heat shock proteins, sHsp) образуют большое семейство близкородственных белков, которые экспрессируются практически во всех царствах живой природы, включая вирусы, бактерии, растения и животные [1]. Ключевым свойством, позволяющим объединять эти белки в одно семейство, является наличие в первичной структуре малых белков теплового шока высоко консервативного  $\alpha$ -кристаллинового домена, состоящего из 80–100 аминокислотных остатков и расположенного, как правило, в С-концевой области белка (рис. 1) [2, 3]. На N- и С-конце кристаллинового домена располагаются переменные по длине и составу последовательности аминокислот, которые формируют мало упорядоченные и высоко подвижные N- и С-концевые домены (рис. 1) [2]. Малые белки теплового шока получили свое название в связи с тем, что молекулярная масса мономеров этих белков невелика и колеблется в интервале от 12 до 43 кДа [4–6]. Как правило, малые белки теплового шока склонны к образованию крупных олигомеров, в состав

---

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

\* Авторы внесли равный вклад в подготовку данной работы.

*Адрес для корреспонденции:* NBGusev@mail.ru

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-35-00026.

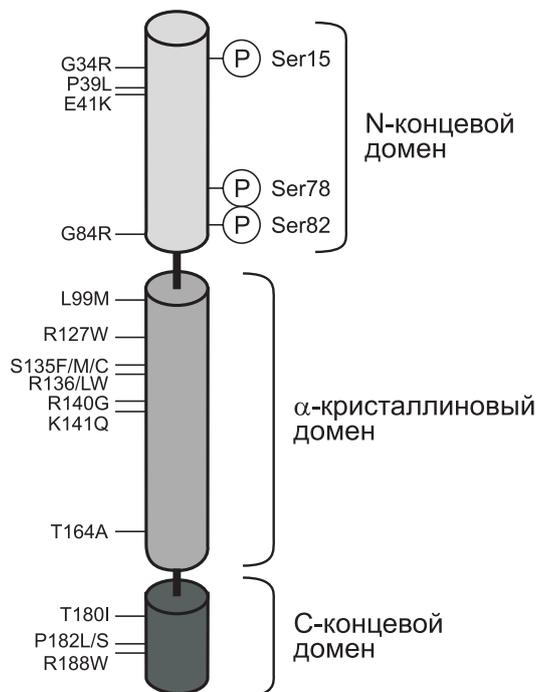


Рис. 1. Схема строения малых белков теплового шока на примере HspB1.

Обозначены N-концевой, α-кристаллиновый и C-концевой домены, а также участки, подвергающиеся фосфорилированию (Ser15, Ser78, Ser82). Схематически показано расположение нескольких остатков, мутации которых коррелируют с развитием нейродегенеративных заболеваний.

которых могут входить более двадцати мономеров одного и того же или нескольких разных малых белков теплового шока [7–9]. Образующиеся гомо- или гетероолигомеры [10, 11] очень лабильны и легко подвергаются обратимым процессам ассоциации и диссоциации, в ходе которых может происходить как увеличение, так и уменьшение количества субъединиц в составе таких олигомеров [9]. Высокая подвижность и лабильность олигомеров сильно затрудняет исследование структуры малых белков теплового шока и в настоящее время в литературе есть данные о строении малых белков теплового шока гипертермофильной архебактерии *Methanocaldococcus jannaschii* [12], пшеницы (*Triticum aestivum*) [13], паразитического червя *Taenia saginata* [14], ацидотермофильной архебактерии *Sulfolobus tokodaii* [15] и протобактерии *Xanthomonas* [16]. Все попытки закристаллизовать полноразмерные малые белки теплового шока млекопитаю-

щих и человека пока не завершились успехом, хотя удалось закристаллизовать разные по длине кристаллиновые домены  $\alpha$ -кристаллина и малых белков теплового шока HspB1 и HspB6 [17–21].

Геном человека содержит 10 генов малых белков теплового шока, продукты которых обозначаются как HspB1–HspB10 [22, 23]. Некоторые представители семейства малых белков теплового шока (такие как HspB1, HspB5, HspB6, HspB8) экспрессируются практически во всех органах и тканях [24]. Другие представители семейства малых белков теплового шока (такие как HspB2, HspB3, HspB4, HspB7, HspB9, HspB10) преимущественно экспрессируются только в определенных органах и тканях [4, 5, 19, 25]. Уровень экспрессии малых белков теплового шока зависит от органа или ткани и может меняться в ходе онтогенеза [26–28]. Кроме того, уровень экспрессии некоторых представителей семейства малых белков теплового шока изменяется в ответ на различные неблагоприятные воздействия, такие как денервация, повышение температуры или ишемия [28, 29]. Содержание некоторых малых белков теплового шока в различных тканях может быть очень высоким и достигать 0,3% от общего содержания белков [30].

Малые белки теплового шока (совместно с другими белками теплового шока) играют важную роль в поддержании гомеостаза и участвуют в контроле над правильным сворачиванием белков [5, 31]. Контроль над правильным сворачиванием белка, часто обозначаемый термином протеостаз (proteostasis), предполагает как проверку правильного сворачивания вновь синтезированных белков, так и отслеживание различных нарушений нативной структуры ранее синтезированных белков. Именно поэтому различные неблагоприятные воздействия, сопровождающиеся накоплением частично денатурированных белков, индуцируют повышенный синтез различных белков теплового шока и в частности некоторых представителей семейства малых белков теплового шока [4–6, 31].

Обеспечение протеостаза осуществляется несколькими, зачастую взаимосвязанными путями. Во-первых, малые белки теплового шока связывают частично денатурированные и потому склонные к агрегации белки. В условиях *in vitro* малые белки теплового шока предотвращают агрегацию различных модельных белков субстратов [32, 33], а в условиях *in vivo* способны предотвращать агрегацию природных белков, таких как хантингтин [34] или  $\beta$ - и/или  $\gamma$ -кристаллины [25]. В клетке малые белки теплового шока не только связывают денатурированные белки и тем самым предотвращают их агрегацию, но также могут передавать такие белки другим белкам

теплового шока, которые, используя энергию АТФ, осуществляют их ренатурацию [35]. Помимо этого малые белки теплового шока способствуют избирательному удалению денатурированных белков путем протеолиза в протеасомах или автофагосомах [36–38].

Во-вторых, малые белки теплового шока могут предотвращать накопление денатурированных белков путем ослабления различных неблагоприятных воздействий. Например, известно, что некоторые малые белки теплового шока способны уменьшать последствия окислительного стресса. HspB1 стабилизирует и активирует несколько ферментов, участвующих в синтезе восстановленного глутатиона, и тем самым снижает накопление активных форм кислорода [39, 40].

В-третьих, малые белки теплового шока способны взаимодействовать практически со всеми белками цитоскелета (актином, тубулином, некоторыми белками промежуточных филаментов) и стабилизировать цитоскелет, предотвращая его разрушение под действием различных неблагоприятных факторов [41–46].

Наконец, в-четвертых, данные литературы свидетельствуют о том, что, как правило, малые белки теплового шока, такие как HspB1, HspB5 и HspB6 обладают выраженной антиапоптотической активностью [39, 47–49]. Очевидно, что все перечисленные свойства малых белков теплового шока взаимосвязаны и поэтому зачастую не могут быть отделены друг от друга. Например, предотвращение агрегации денатурированных белков, стабилизация цитоскелета или защита от окислительного стресса являются одним из механизмов, блокирующих протекание апоптоза. В то же время антиапоптотический эффект малых белков теплового шока может быть обусловлен другими причинами, например, с их способностью связываться и регулировать активность некоторых протеинкиназ или с их способностью регулировать выход цитохрома *c* из митохондрий [47, 48]. Как бы то ни было, даже краткий перечень функций, которые малые белки теплового шока могут выполнять в клетке, убедительно свидетельствует о том, что указанная группа белков играет очень важную роль во многих ключевых процессах, протекающих в клетке. В связи с этим можно предположить, что мутации малых белков теплового шока могут привести к тяжелым изменениям в нормальном функционировании клеток, что может явиться причиной возникновения различных заболеваний. Действительно, в настоящее время накоплен достаточно большой фактический материал, свидетельствующий о том, что мутации малых белков теплового шока коррелируют с возникновением различных врожденных заболеваний, таких как катаракта, миофибриллярная миопатия, некоторые формы кардиомиопатии и врожденная дистальная невропатия [50–52]. В этом

обзоре мы хотели бы описать свойства некоторых мутантных форм малых белков теплового шока HspB1, HspB3 и HspB8, экспрессия которых коррелирует только с одним врожденным заболеванием, дистальной невропатией, и попытаться понять, почему анализируемые мутации могут приводить к возникновению этой болезни.

## **II. ВРОЖДЕННАЯ ДИСТАЛЬНАЯ НЕВРОПАТИЯ**

Врожденная дистальная невропатия или болезнь Шарко-Мари-Ту (ШМТ) (Charcot-Marie-Tooth disease, CMT) была впервые описана в 1886 году, и в настоящее время считается одной из наиболее распространенных периферических невропатий, диагностируемой у одного из каждых 2500 жителей [53]. Это заболевание может возникать как в раннем (первые 10–20 лет жизни), так и в преклонном возрасте (старше 70 лет) и проявляется в медленном ослаблении дистальных мышц, которое со временем может приводить к полной атрофии указанных мышц. Как правило, заболевание сначала поражает мышцы нижних конечностей и постепенно затрагивает мышцы верхних конечностей и кистей рук, в результате чего снижается возможность передвигаться и манипулировать мелкими предметами. Зачастую эти симптомы дополняются развивающейся глухотой, тремором рук, параличом диафрагмы, атрофией зрительного нерва и поражением почек [53, 54].

Болезнь Шарко-Мари-Ту является гетерогенной патологией, и в настоящее время предложена достаточно сложная классификация этого врожденного заболевания. Выделяют две клинических формы этой болезни. Первая группа характеризуется пониженной скоростью передачи нервного сигнала (скорость менее 38 м/с). Причиной этого типа заболеваний является поражение миелиновой оболочки нервов. В этой группе заболеваний выделяют аутосомно-доминантную (так называемая AD CMT1) и аутосомно-рецессивную (так называемая AR CMT1 или CMT4) формы дистальной невропатии. Каждая из указанных подгрупп разбивается на дополнительные классы (обозначаемые буквами латинского алфавита) в зависимости от того, какой из генов оказывается мутированным. Среди генов, мутации которых связаны с развитием аутосомно-доминантных или аутосомно-рецессивных форм болезни Шарко-Мари-Ту первого типа (CMT1), упоминаются гены периферического миелинового белка 22 (peripheral myelin protein 22), миелинового белка ноль (myelin protein zero), малого интегрального белка лизосом/поздних эндосом (small integral membrane protein of lysosome/late endosome, SIMPLE) и

многих других белков. Мутации периферического миелинового белка 22 и миелинового белка ноль наиболее часто являются причиной возникновения болезни Шарко-Мари-Ту первого типа [55].

Во вторую большую группу относят такие формы болезни Шарко-Мари-Ту, при которых не происходит изменения скорости проведения нервного импульса и структуры миелиновой оболочки, но при этом отмечаются патологические изменения в аксонах моторных и/или сенсорных нейронов. В этой большой группе (обычно обозначаемой как болезнь Шарко-Мари-Ту второго типа или СМТ2) выделяют аксональные аутосомно-доминантные и аксональные аутосомно-рецессивные заболевания. Как и в предыдущем случае, к обозначению СМТ2 добавляют заглавную букву латинского алфавита, которая обозначает, мутации каких белков происходят при той или иной форме заболевания. Аксональные формы болезни Шарко-Мари-Ту могут быть связаны с мутациями таких белков, как моторные белки (кинезин или тяжелые цепи динеина), белки, связанные с динамикой митохондрий (например, белок митофузин 2), белки цитоскелета (легкая форма белка нейрофиламентов или ламинов А и С), малые белки теплового шока (HspB1 и HspB8) и некоторые другие белки [53, 56].

В третью и четвертую группу относят такие формы болезни Шарко-Мари-Ту, которые характеризуются промежуточной скоростью передачи нервного сигнала (так называемые промежуточные формы или DI-СМТ, для которых характерен преимущественно аутосомно-рецессивный тип наследования, и которые обозначаются как СМТ4) и, наконец, формы, связанные с мутациями в X-хромосоме, обозначаемые либо как сопряженные с X-хромосомой формы (СМТХ) или как СМТ5 [53, 57, 58]. В этих группах симптомы болезни Шарко-Мари-Ту особенно часто наблюдаются при мутациях белка щелевых контактов  $\beta 1$  (gap junction protein  $\beta 1$ , connexin-32) [55].

Возникает закономерный вопрос, почему мутации более чем в 30 различных генах приводят к возникновению болезни со сходными симптомами. В настоящее время трудно однозначно ответить на этот вопрос. Попробуем сузить вопрос и проанализировать процессы, происходящие при аксональных формах болезни Шарко-Мари-Ту второго типа (СМТ2). В этом случае одно из возможных объяснений может состоять в том, что происходят нарушения различных процессов, связанных с внутриклеточным перемещением органелл и везикул [53, 56]. Длина аксонов моторных и/или сенсорных нейронов может превосходить 1 м [56], и поэтому нейроны должны обеспечивать быстрый и эффективный транспорт органелл, везикул и белков на

большие расстояния. Очевидно, что мутации моторных белков, таких как тяжелые цепи динеина [59] или p150 субъединица динактинового комплекса [60], участвующего в динеин-зависимом транспорте органелл по микротрубочкам, или кинезина KIF1B [61], также обеспечивающего перемещение грузов по микротрубочкам, могут существенно затруднить как ретроградный, так и антероградный транспорт в теле нейронов, вероятным следствием которого является болезнь Шарко-Мари-Ту второго типа. Мутация малого G-белка RAB7, отвечающего за взаимодействие между специальными адаптерными белками и белками-моторами и за перемещение эндосом в клетке [62], также сопровождается развитием болезни Шарко-Мари-Ту второго типа [63]. Поскольку промежуточные филаменты являются важными компонентами цитоскелета нейронов, мутации белков нейрофиламентов могут также быть причиной возникновения болезни Шарко-Мари-Ту. Действительно, описаны мутации легкого компонента нейрофиламентов, коррелирующие с возникновением болезни Шарко-Мари-Ту [64–66]. Кроме того, короткие промежуточные филаменты могут транспортироваться по микротрубочкам с помощью белков-моторов (кинезинов) и поэтому мутации белков промежуточных филаментов, сопровождающиеся их агрегацией или изменением прочности связывания с белками-моторами также могут влиять на транспортные процессы в длинных аксонах нейронов.

Попытаемся дать ответ на вопрос, почему мутации малых белков теплового шока каким-то образом связаны с болезнью Шарко-Мари-Ту второго типа и/или дистальной наследственной моторной невропатией. Рассуждая механистически, можно предположить, что те или иные мутации приводят либо к потере каких-то полезных свойств (loss-of-function), либо к приобретению новых вредных свойств и функций (gain-of-function). Очевидно, что эти процессы могут происходить как последовательно, так и параллельно и их трудно отделить один от другого. Тем не менее, приобретение новых свойств мутантными белками зачастую сопровождается уменьшением их стабильности и увеличением склонности к агрегации, что может привести к связыванию других белков и формированию нерастворимых агрегатов в теле клетки. Исчезновение каких-то свойств малых белков теплового шока вследствие мутации может сопровождаться потерей ими способности образовывать гомо- и гетероолигомеры с определенными свойствами и размерами или изменением их шапероноподобной активности. Попытаемся проанализировать свойства некоторых мутантов малых белков теплового шока, опираясь на эти простые правила.

### III. МУТАЦИИ МАЛОГО БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА HSPB1 И ВРОЖДЕННАЯ ДИСТАЛЬНАЯ НЕВРОПАТИЯ

В настоящее время в литературе описано около 20 различных мутаций HspB1, коррелирующих с развитием болезни Шарко-Мари-Ту второго типа или врожденной моторной невропатии [35, 51, 67] и представленных в базе данных HMGD Pro v.2014.2. Среди описанных мутаций большая часть представлена миссенс мутациями, приводящими к точечным заменам отдельных аминокислот, однако есть одна мутация со сдвигом рамки считывания, приводящая к синтезу укороченной формы белка, содержащей к тому же короткую последовательность, отсутствующую в белке дикого типа, и одна мутация, приводящая к преждевременному появлению стоп-кодона и синтезу укороченной формы белка [51, 67]. Условно все мутации HspB1 можно разделить по тому, в каком месте молекулы белка произошли точечные замены (рис. 1). Как уже отмечалось, в структуре малых белков теплового шока выделяют высоко подвижный, мало упорядоченный и достаточно вариабельный N-концевой домен, консервативный преимущественно  $\beta$ -складчатый  $\alpha$ -кристаллиновый домен и подвижный мало консервативный C-концевой домен [2].

В начале N-концевого домена HspB1 обнаружены три точечные мутации G34R, P39L и E41K (рис. 1) [68, 69]. Первые две мутации коррелировали с поздним (старше 50 лет) развитием дистальной врожденной моторной невропатии, в то время как мутация E41K сопровождалась проявлением симптомов этой болезни в раннем возрасте (моложе 10 лет). Остатки G34 и P39 высоко консервативны и сохраняются в последовательностях почти всех HspB1 из тканей млекопитающих, птиц, рептилий и амфибий. Остаток E41 несколько менее консервативен и может быть заменен в последовательности HspB1 некоторых млекопитающих, птиц и рептилий на остаток аспарагиновой кислоты (но никогда на положительно заряженный остаток) [67]. Проведенные в нашей группе исследования [69a] показали, что три перечисленных мутации приводят к формированию олигомеров, размер которых несколько больше олигомеров белка дикого типа. Олигомеры мутантных белков более устойчивы к ограниченному химотрипсинолизу, но обладают пониженной термостабильностью по сравнению с белком дикого типа. Мутанты HspB1 с заменами в N-концевом домене фосфорилируются MAPKAP2 киназой со скоростью и эффективностью, сопоставимой со скоростью фосфорилирования белка дикого типа. Однако, если фосфорилирование белка дикого типа до  $\sim 1$  моль фосфата на моль белка приводит к

практически полной диссоциации крупных олигомеров до димеров и/или тетрамеров, то фосфорилирование мутантных белков до уровня 2 моля фосфата на моль белка (и даже больше) не приводит к существенной диссоциации крупных олигомеров этих белков. Шапероноподобная активность мутантов HspB1 с заменами в N-концевом домене, как правило, меньше аналогичной активности белка дикого типа. Суммируя полученные результаты, можно заключить, что анализируемые мутанты образуют более крупные олигомеры, в составе которых мономеры прочно взаимодействуют друг с другом, что частично или полностью исключает диссоциацию олигомеров, индуцируемую фосфорилированием. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что фосфорилирование и сопровождающая этот процесс диссоциация олигомеров HspB1 играют важную роль как во взаимодействии этого малого белка теплового шока с различными элементами цитоскелета, так и в регуляции его шапероноподобной активности. Таким образом, анализируемые мутации сопровождаются появлением как новых свойств (устойчивость к вызванной фосфорилированием диссоциацией), так и утерей характерных для белка дикого типа свойств (уменьшением шапероноподобной активности).

Две другие мутантные формы HspB1, свойства которых были изучены сравнительно подробно, несут точечные замены в самом конце N-концевого домена (G84R) и в самом начале кристаллинового домена (L99M) (Рис.1). Обе мутации коррелируют с дистальной врожденной миопатией с доминантным наследованием в случае мутации G84R и, по всей видимости, с рецессивным наследованием в случае мутации L99M, при этом признаки заболевания проявляются в среднем возрасте [67, 68, 70]. Оба указанных остатка высоко консервативны и сохраняются в первичной структуре HspB1 из тканей млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий и даже рыб [67]. Любопытно отметить, что эти остатки столь консервативны, что они сохраняются даже в первичной структуре тех малых белков теплового шока человека, которые склонны к образованию крупных олигомеров, таких как HspB4 и HspB5 [71]. В то же время в структуре малых белков теплового шока, не способных образовывать крупные олигомеры (HspB6 и HspB8), либо остаток глицина в положении, гомологичном G84, либо остаток лейцина в положении, гомологичном L99, заменены на другие аминокислотные остатки [71]. Исследование структуры мутантов G84R и L99M показало, что оба белка образуют олигомеры, размеры которых больше размеров олигомеров, образованных белком дикого типа. Однако эти

олигомеры достаточно нестабильны и, в отличие от аналогичных олигомеров белка дикого типа, легко диссоциируют до димеров и/или тетрамеров. Оба мутанта фосфорилируются MAPKAP2 киназой со скоростью и эффективностью, сопоставимой со скоростью фосфорилирования белка дикого типа. При длительной инкубации степень фосфорилирования всех исследуемых белков достигает 3 молей фосфата на моль белка и все потенциальные участки (Ser15, Ser78, Ser82) оказываются фосфорилированными. Однако при низкой степени фосфорилирования (около 0,6 молей фосфата на моль белка) крупные олигомеры белка дикого типа лишь частично диссоциируют до димеров и тетрамеров, в то время как олигомеры обоих анализируемых мутантов полностью диссоциируют до малых олигомеров [71]. HspB1 дикого типа может образовывать два типа гетероолигомеров с кажущимися молекулярными массами ~100–120 и ~300 кДа с другим малым белком теплового шока HspB6, в то время как анализируемые мутанты образуют гетероолигомеры только одного типа с кажущейся молекулярной массой ~120 кДа. В опытах *in vitro* мутанты G84R и L99M обладают меньшей шапероноподобной активностью, чем белок дикого типа [71]. Суммируя полученные данные, можно заключить, что мутации G84R и L99M, также как и мутации в самом N-концевом домене HspB1, приводят к образованию олигомеров большего размера, чем соответствующие олигомеры белка дикого типа. Однако, если мутации в самом N-концевом домене (G34R, P39L и E41K) каким-то образом стабилизируют структуру олигомеров, то мутации G84R и L99M, напротив, дестабилизируют структуру крупных олигомеров и провоцируют диссоциацию олигомеров, индуцируемую фосфорилированием. Можно предположить, что замена маленького подвижного остатка глицина в положении 84 на объемный остаток аргинина приводит к переориентации или изменению подвижности всего N-концевого домена, следствием чего может быть ослабление прочности взаимодействия мономеров в составе олигомеров [71]. Молекулярный механизм, лежащий в основе изменений структуры белка, вызываемых мутацией L99M, недостаточно ясен, однако можно предположить, что указанная точечная мутация может влиять на взаимодействие между антипараллельно расположенными  $\beta$ 7-складками двух соседних мономеров HspB1 и тем самым дестабилизировать структуру всего олигомера [71].

Наиболее подробные исследования были выполнены на мутантах HspB1 с заменами в центральной части  $\alpha$ -кристаллинового домена (рис. 1). Мутации R127W, S135F и R136W/L ассоциированы с врож-

денной дистальной невропатией, проявляющейся в раннем и среднем возрасте с доминантным типом наследования [72–75]. Все три остатка высоко консервативны и сохраняются в соответствующих позициях в первичной структуре HspB1 млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий и даже рыб. Только в некоторых случаях остаток аргинина в положении, гомологичном R127, оказывается замененным на остаток лизина [67]. В работе Альмейда-Соуза и соавт. [76] были подробно исследованы свойства трех анализируемых мутантов HspB1. Авторы обнаружили, что мутации R127W и S135W сопровождаются не уменьшением, а увеличением шапероноподобной активности, и эти мутанты оказались более эффективными в защите клеток от теплового шока, чем белки дикого типа. Более того, по данным этих авторов мутанты R127W, S135F и R136W обладают большим средством к денатурированным белкам-мишеням, чем белок дикого типа. По мнению Альмейда-Соуза и соавт. [76], как увеличение прочности связывания белков-мишеней, так и увеличение эффективности в защите клеток от теплового шока может быть хотя бы отчасти обусловлено тем, что указанные мутации приводят к дестабилизации димеров HspB1 без изменения способности мономеров образовывать крупные олигомеры. Таким образом, анализируемые мутации способствуют мономеризации HspB1, следствием чего является существенное увеличение шапероноподобной активности.

Если это действительно так, то возникает вопрос, почему мутанты R127W, S135F и R136W, обладающие более высокой шапероноподобной активностью и лучшей способностью защищать клетки от неблагоприятных условий, чем белок дикого типа, могут приводить к возникновению дистальной невропатии? Объяснение может состоять в том, что некоторые из этих мутантов (например, S135F) очень прочно взаимодействуют с легким компонентом нейрофиламентов, и это взаимодействие столь прочно, что комплекс этих белков выпадает в осадок и образует аморфные агрегаты в клетке [72]. С этими наблюдениями в определенной степени согласуются недавно полученные данные, свидетельствующие о том, что точечные мутанты R127W и S135W влияют на связывание нейрофиламентов с кинезином и уменьшают антероградный транспорт нейрофиламентов в клетке [77]. По мнению авторов, этот эффект связан с увеличением степени фосфорилирования нейрофиламентов под действием циклин-зависимой протеинкиназы Cdk5 и может быть частично обращен путем ингибирования этой протеинкиназы [77]. Опыты, проведенные на трансгенных мышах, экспрессирующих мутант R136W, показали, что у этих животных с возрастом развивается аксо-

нопатия, сопровождающаяся выраженным повреждением системы нейрофиламентов и системы внутриклеточного транспорта. Более того, у этих трансгенных животных были выявлены нарушения взаимодействия аксона со Шванновскими клетками [78].

Было проведено подробное исследование взаимодействия мутантов R127W и S135W с тубулином и микротрубочками. В ходе этого исследования было установлено, что мутанты очень прочно взаимодействуют как с изолированным тубулином, так и с микротрубочками и увеличивают устойчивость микротрубочек к действию различных факторов, в частности к действию нокодазола [79]. Были проведены опыты на линии трансгенных мышей, экспрессирующих S135F мутант HspB1, и было установлено, что в этом случае микротрубочки обладают повышенной стабильностью и сравнительно низким уровнем ацетилирования [80]. Было высказано предположение, что анализируемые мутанты HspB1 прочно связываются с микротрубочками и значительно повышают их стабильность. Чрезмерно стабильные микротрубочки препятствуют нормальным процессам, протекающим в клетке. Вследствие этого происходит компенсаторное увеличение активности деацетилаз, которые деацетилируют тубулин и приводят к резкой дестабилизации микротрубочек, которая уже не может быть компенсирована даже присутствием мутантных форм HspB1 [81]. Результатом всех этих процессов является деполимеризация микротрубочек и нарушение аксонального транспорта, что может быть молекулярным механизмом, ведущим к появлению симптомов дистальной невропатии. Таким образом, опыты, проведенные на изолированных белках, на культивируемых клетках и трансгенных животных, свидетельствуют о том, что мутанты R127W, S135F и R136W способны образовывать прочные комплексы с белками цитоскелета (белки промежуточных филаментов, тубулин), и это может быть одной из причин, лежащих в основе возникновения невропатии. Помимо этого, мутант S135F HspB1 прочнее, чем белок дикого типа, взаимодействует с другим малым белком теплового шока HspB8 [82]. Более прочное взаимодействие мутантного HspB1 с HspB8 может приводить к тому, что значительные количества HspB8 оказываются связанными с мутантным белком и в силу этого HspB8 оказывается неспособным выполнять те функции, которые он в обычных условиях должен выполнять в клетке.

Мутации R140G и K141Q связаны со сравнительно поздним (старше 30 лет) возникновением дистальной наследственной моторной невропатии [68, 83]. Оба остатка высоко консервативны и сохраняются с минимальными заменами в первичной структуре HspB1

млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий и рыб [67]. В условиях *in vitro* оба мутанта обладают меньшей термостабильностью, чем белок дикого типа [84]. Олигомерное состояние мутанта K141Q практически не отличается от олигомерного состояния белка дикого типа, и оба белка образуют стабильные олигомеры сходного размера. В то же время мутант R140G представлен в виде смеси, состоящей из малых олигомеров (димеров или тетрамеров) и очень больших, склонных к дальнейшей агрегации олигомеров, размеры которых значительно больше размеров олигомеров белка дикого типа [44, 84]. Белок дикого типа способен предотвращать агрегацию олигомеров мутанта R140G либо образуя смешанные олигомеры, либо за счет своей шапероноподобной активности. Мутант K141Q обладает шапероноподобной активностью, сопоставимой с шапероноподобной активностью белка дикого типа, и образует такие же как белок дикого типа гетероолигомерные комплексы с другим малым белком теплового шока, HspB6. В отличие от этого, мутант R140G обладает сильно пониженной шапероноподобной активностью и значительно менее эффективно взаимодействует с HspB6, чем белок дикого типа [84].

Подводя итоги, можно заключить, что мутации в центральной части  $\alpha$ -кристаллинового домена затрагивают область межсубъединичных контактов, образованных двумя антипараллельными  $\beta$ 7 складками двух соседних мономеров HspB1 (см. модельные структуры, представленные в статьях Альмейда-Соуза и соавт. [76] и Нефедовой и соавт. [84]). Мутации R127W, S135F и R136W существенно дестабилизируют межсубъединичные контакты и по данным литературы способствуют мономеризации HspB1 [76]. Мономеры мутантных форм HspB1 обладают высоким сродством к некоторым белкам цитоскелета и другим малым белкам теплового шока, следствием чего является приобретение новых нежелательных свойств, приводящее к нарушению нормального функционирования цитоскелета и к связыванию и выведению из строя других малых белков теплового шока. Мутация R140G расположена в так называемой горячей точке, т.е. в том участке первичной структуры, изменения в котором приводят к драматическим изменениям свойств не только HspB1, но и других малых белков теплового шока. Действительно, мутация R116C/H в HspB4, мутация R120G в HspB5, а также мутация K141E/N/T в HspB8, расположенные в участке, гомологичном остатку R140 HspB1, сопровождаются развитием таких различных врожденных заболеваний как катаракта (в случае HspB4 [85, 86]), кардиомиопатия и миофибриллярная миопатия (в случае HspB5 [87, 88]) или болезнь Шарко-Мари-Ту или врожденная дистальная

невропатия (в случае HspB8 [74, 89]). Соответствующие остатки аргинина (или лизина) участвуют в образовании солевых мостиков с отрицательно заряженными остатками соседнего мономера и таким образом стабилизируют структуру всего олигомера малых белков теплового шока. Вероятно, именно поэтому мутация R140G HspB1 сопровождается образованием равновесной смеси, состоящей из маленьких и больших олигомеров белка, склонных к дальнейшей агрегации. Существенные изменения в структуре, вызываемые мутацией R140G, приводят к значительному ослаблению шапероноподобной активности и изменению способности этого мутанта взаимодействовать с другими малыми белками теплового шока. Удивительно, но мутация соседнего остатка (K141Q) оказывает заметно более слабое влияние на свойства HspB1. Это может быть связано с тем, что положительно заряженный остаток K141 хотя и способен участвовать в образовании межсубъединичных контактов за счет формирования солевого мостика с отрицательно заряженными остатками соседнего мономера, расположен на периферии этого контакта и поэтому не оказывает столь существенного влияния, как соседний 140 остаток [84]. Тем не менее мутация K141Q, также как и мутация R140G, сопровождается уменьшением термической стабильности HspB1 [84].

В последнее время появились данные о некоторых свойствах мутантов HspB1 с заменами в С-концевой части кристаллинового домена и в вариабельном С-концевом домене (рис. 1). Мутация T164A затрагивает остаток треонина, расположенный в последней девятой  $\beta$ -складке кристаллинового домена. Этот остаток достаточно консервативен и сохраняется в первичной структуре HspB1 многих млекопитающих, птиц, амфибий и рыб [90]. Указанная мутация была выявлена у китайца народности хан, проживающего на Тайване. Заболевание начало проявляться в раннем возрасте и сопровождалось потерей чувствительности и тяжелой атрофией мышц нижних и верхних конечностей [91]. Мутации T180I, P182L/S и R188W локализованы в подвижном С-концевом домене HspB1. Остаток T180 довольно консервативен и сохраняется в первичной структуре HspB1 млекопитающих, птиц и рептилий, но оказывается замененным на остатки серина, аланина, аспарагина, изолейцина или валина у некоторых амфибий и рыб [67]. Остаток P182 в высшей степени консервативен и сохраняется в первичной структуре HspB1 практически всех проанализированных видов животных [67]. Наконец, остаток R188 не очень консервативен, он сохраняется в первичной структуре HspB1 практически всех исследованных

млекопитающих, но заменен на разные остатки в структуре HspB1 других видов животных. Для большинства анализируемых мутаций характерен преимущественно доминантный путь наследования и все указанные мутации сопровождаются появлением первых симптомов заболевания в раннем возрасте (моложе 18 лет). Мутация T180I коррелирует с симптомами, характерными для врожденной дистальной невропатии [69], или для болезни Шарко-Мари-Ту второго типа [92]. Мутация P182L/S приводит к раннему или очень раннему (моложе 5 лет) проявлению симптомов врожденной дистальной невропатии [72, 74, 93]. Наконец, мутация R188W сопровождается ранним (моложе 10 лет) проявлением симптомов, характерных для болезни Шарко-Мари-Ту второго типа [69].

Изучение физико-химических свойств показало, что мутации T164A и P182S сопровождаются значительным уменьшением термостабильности белка [90]. Олигомеры, образованные мутантом T164A, были достаточно нестабильны и склонны к диссоциации. В тоже время точечная мутация P182S приводила к образованию очень крупных, склонных к агрегации олигомеров HspB1. Любопытно отметить, что мутант P182S был способен образовывать смешанные олигомеры с HspB1 дикого типа, которые обладали более высокой термостабильностью и меньшей склонностью к агрегации, чем гомеолигомеры P182S [90]. Шапероноподобная активность T164A и T180I мутантов была сопоставимой, хотя и несколько меньше шапероноподобной активности белка дикого типа, а мутанты R188W и особенно P182S обладали шапероноподобной активностью, существенно меньшей, чем аналогичная активность белка дикого типа [90].

В опытах, выполненных на клеточном уровне, было установлено, что в условиях *in vivo* мутант P182L обладал шапероноподобной активностью, сопоставимой с шапероноподобной активностью белка дикого типа, и почти столь же эффективно, как белок дикого типа, защищал клетки от теплового шока [76]. В то же время экспрессия мутанта P182L сопровождалась накоплением в клетках нерастворимых белковых агрегатов, увеличением степени фосфорилирования нейрофиламентов, изменением внутриклеточного транспорта и повреждением нейрофиламентов [77], а также изменением внутриклеточной локализации белка p150 динактина и синаптогамина [94]. Японские исследователи также высказывают предположение, что мутация P182S сопровождается повреждением сети нейрофиламентов [93]. Данные о влиянии P182L мутанта на систему микротрубочек довольно противоречивы. В опытах, выполненных на клеточном уровне, было показано, что этот мутант не связывается с

микротрубочками и, в отличие от мутантов с заменами в центральной части кристаллинового домена (S135F, R136W), не влияет на степень ацетилирования тубулина [79]. В то же время в опытах, выполненных на трансгенных мышах, было установлено, что мутация P182L сопровождается существенным уменьшением уровня ацетилирования тубулина, а симптомы, связанные с такой мутацией HspB1, могут быть частично или полностью предотвращены при использовании ингибиторов деацетилаз [80].

В настоящее время довольно трудно дать детальное описание молекулярных механизмов, лежащих в основе возникновения нейродегенеративных заболеваний, связанных с мутациями в С-концевой области HspB1. Это связано с тем, что пока нет детальных структурных данных, касающихся локализации этой части молекулы белка в олигомерах HspB1. Данные литературы [17, 95–97] свидетельствуют о том, что консервативный трипептид I–P–I(V), находящийся в неупорядоченном С-концевом домене  $\alpha$ -кристаллина (и HspB1) может взаимодействовать с гидрофобной канавкой, образованной  $\beta$ 4 и  $\beta$ 8 складками того же или соседнего мономера. Поэтому самая С-концевая последовательность кристаллина и HspB1 может играть важную роль в образовании стабильных олигомеров этих малых белков теплового шока. Вероятно, именно поэтому мутация остатка P182, находящегося в центре этого трипептида, приводит к драматическим изменениям олигомерного состояния, шапероноподобной активности и способности взаимодействовать с белками-мишенями и белками-партнерами. Возможно, аналогичным образом можно объяснить и влияние мутации T180I. Действительно, остаток T180 непосредственно примыкает к консервативному трипептиду I–P–V HspB1, при этом замена T180I приводит к образованию гидрофобного кластера, состоящего из трех следующих друг за другом остатков изолейцина. Как уже упоминалось, мутация T164A расположена в центре  $\beta$ 9 складки и, вероятно, каким-то образом влияет на ориентацию или подвижность С-концевого домена. Можно предположить, что именно поэтому мутация T164A вызывает существенную дестабилизацию олигомерной структуры HspB1. Остаток R188 расположен на самом С-конце молекулы HspB1. Эта часть молекулы малых белков теплового шока обладает высокой подвижностью [98] и играет важную роль во взаимодействии малых белков теплового шока с белками-мишенями [99, 100]. Вероятно, именно поэтому замена заряженного остатка аргинина на объемный и гидрофобный остаток триптофана приводит к существенному

уменьшению шапероноподобной активности и, возможно, изменению взаимодействия HspB1 с различными белками-мишенями.

Попытаемся сопоставить экспериментальные данные, полученные на разных мутантных формах HspB1. Мутации в N-концевом домене (G34R, P39L, E41K) сопровождаются увеличением прочности гомоолигомерных комплексов, образованных HspB1, что затрудняет диссоциацию этих крупных олигомеров при фосфорилировании (таблица). Это может приводить к существенному изменению многих свойств HspB1 и быть одной из причин, ведущих к появлению симптомов невропатий. Мутации в C-концевой области N-концевого домена и в начале кристаллинового домена (G84R, L99M), напротив, приводят к дестабилизации олигомеров и к определенному уменьшению шапероноподобной активности HspB1 (таблица), следствием чего опять же может стать развитие невропатии. Мутации в центральной части кристаллинового домена (R127W, S135F, R136W) сопровождаются изменением межмономерных взаимодействий и зачастую приводят к увеличению сродства HspB1 к определенным белкам-мишеням (таблица). Вследствие этого нарушается нормальный процесс полимеризации/деполимеризации микротрубочек, что ведет к повреждению аксонального транспорта и гибели нейронов. Точечная мутация R140G, затрагивающая положительно заряженный остаток аргинина, участвующий в межмономерных взаимодействиях, приводит к драматическим изменениям структуры HspB1 и значительному уменьшению его шапероноподобной активности (таблица). Мутация T164A на C-конце кристаллинового домена (также как и мутация L99M на N-конце кристаллинового домена) сопровождается дестабилизацией четвертичной структуры HspB1 (таблица). Как уже отмечалось, C-концевой домен играет важную роль в стабилизации четвертичной структуры и во взаимодействии HspB1 с различными белками-мишенями или белками-партнерами. Поэтому мутации в этой области могут приводить как к существенному уменьшению шапероноподобной активности (P182L/S, R188W), так и к формированию олигомеров (агрегатов) очень больших размеров (P182L/S) (таблица). Следствием этого является изменение гомеостаза, приводящее к гибели нейронов и развитию невропатии.

Таблица.  
**Доменная локализация и некоторые свойства точечных мутантов HspB1, экспрессия которых коррелирует с развитием различных форм дистальной невропатии**

Мутация	Олигомерное состояние	Шапероноподобная активность	Дополнительные свойства
<b>N-концевой домен</b>			
G34R	Стабильные крупные олигомеры*	Зависит от природы субстрата, обычно несколько понижена*	Повышенная устойчивость к химотрипсинолизу, пониженная способность к диссоциации после фосфорилирования MAPKAP2 киназой [69a]
P39L	Стабильные крупные олигомеры*	Зависит от природы субстрата, обычно несколько понижена*	Повышенная устойчивость к химотрипсинолизу, пониженная способность к диссоциации после фосфорилирования MAPKAP2 киназой [69a]
E42K	Стабильные крупные олигомеры*	Зависит от природы субстрата, обычно несколько понижена*	Повышенная устойчивость к химотрипсинолизу, пониженная способность к диссоциации после фосфорилирования MAPKAP2 киназой [69a]
G84R	Крупные олигомеры, склонные к диссоциации при разведении* [71]	Немного снижена* [71]	Повышенная склонность к диссоциации после фосфорилирования MAPKAP2 киназой [71]
<b><math>\alpha</math>-кристаллиновый домен</b>			
L99M	Крупные олигомеры, склонные к диссоциации при разведении* [71]	Немного снижена* [71]	Повышенная склонность к диссоциации после фосфорилирования MAPKAP2 киназой [71]
R127W	Крупные олигомеры с измененными межмономерными контактами	Эффективно защищает клетки от теплового шока, повышенная шапероноподобная активность** [76]	Повышенное сродство к тубулину, стабилизация структуры микротрубочек** [76]
S135F	Крупные олигомеры с измененными межмономерными контактами	Эффективно защищает клетки от теплового шока, повышенная шапероноподобная активность** [76]	Повышенное сродство к тубулину, стабилизация структуры микротрубочек** [76]

*Окончание табл. см. на сл. стр.*

Окончание табл.

Мутация	Олигомерное состояние	Шапероноподобная активность	Дополнительные свойства
R136W	Крупные олигомеры с измененными межмономерными контактами	Эффективно защищает клетки от теплового шока, повышенная шапероноподобная активность** [76]	Повышенное сродство к тубулину, стабилизация структуры микротрубочек** [76]
R140G	Агрегаты и нестабильные олигомеры* [84]	Значительно понижена* [84]	Повышенная чувствительность к трипсинолизу* [84]
K141Q	Стабильные крупные олигомеры неотличимые от олигомеров белка дикого типа* [84]	Неотличима от аналогичной активности белка дикого типа* [84]	Минимальные отличия от аналогичных свойств белка дикого типа [84]
T164A	Крупные олигомеры, склонные к диссоциации при разведении* [90]	Неотличима от аналогичной активности белка дикого типа* [90]	Пониженная термическая стабильность [90]
<b>С-концевой домен</b>			
T180I	Стабильные крупные олигомеры, неотличимые от олигомеров белка дикого типа* [90]	Незначительно снижена* [90]	Повышенная термическая стабильность [90]
P182L/S	Очень крупные олигомеры, склонные к агрегации*** [90, 94]	Значительно понижена* [90]/ Не выявлено отличий от белка дикого типа** [76]	Индукция агрегации нейрофиламентов** [94]. Повышение степени фосфорилирования и нарушение транспорта фрагментов нейрофиламентов** [77]
R188W	Стабильные крупные олигомеры* [90]	Значительно понижена* [90]	Минимальные отличия от соответствующих свойств белка дикого типа [90]

\* – данные получены *in vitro*\*\* – данные получены *in vivo*

#### **IV. МУТАЦИЯ МАЛОГО БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА HSPB3 И АКСОНАЛЬНАЯ НЕВРОПАТИЯ**

В настоящее время описана одна мутация HspB3, ассоциированная с врожденной аксональной преимущественно моторной невропатией [101]. В этом случае остаток аргинина в положении 7 заменен на остаток серина (R7S). В большинстве малых белков теплового шока человека (за исключением HspB9) в положении, гомологичном R7 HspB3, располагаются положительно заряженные остатки лизина или гистидина [67]. Поэтому можно предположить, что замена положительно заряженного остатка аргинина на нейтральный полярный остаток серина каким-то образом влияет на структуру и свойства этого белка. К сожалению, структура и свойства HspB3 пока что изучены крайне поверхностно. Известно, что в отличие от других малых белков теплового шока человека этот белок склонен к образованию тримеров и, хотя обладает шапероноподобной активностью, может предотвращать агрегацию только строго определенных белков-субстратов [102]. Функции, выполняемые этим белком в клетке, также мало изучены, хотя известно, что он может образовывать гетероолигомеры, состоящие из 4, 8, 12, 16, 20 или 24 субъединиц с малым белком теплового шока HspB2. При этом в составе этих гетероолигомеров стехиометрия HspB2/HspB3 составляет 3/1 [103]. HspB2 также исследован довольно поверхностно [104] при этом считается, что он является возможным регулятором активности протеинкиназы, связанной с миотонической дистрофией (myotonic dystrophy protein kinase) [105]. Можно высказать предположение, что мутация R7S HspB3 каким-то образом влияет на его взаимодействие с HspB2, что сказывается на функционировании указанной протеинкиназы.

#### **V. МУТАЦИЯ МАЛОГО БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА HSPB8 И НЕВРОПАТИИ ЧЕЛОВЕКА**

Описаны три точечные мутации HspB8 (K141E, K141T, K141N), при этом все мутации затрагивают один и тот же остаток K141 в структуре белка [74, 89, 106, 107]. Судя по всему, эти мутации наследуются по доминантному типу и сопровождаются сравнительно ранним (14–15 лет) появлением симптомов дистальной врожденной мышечной невропатии или различных видов болезни Шарко-Мари-Ту [67]. Остаток K141 HspB8 располагается в центре  $\beta$ 7 складки кристаллинового домена, в положении гомологичном R116  $\alpha$ A-кристаллина (HspB4), R120  $\alpha$ B-кристаллина (HspB5) и R140 HspB1. Как

уже отмечалось, мутации в указанных участках сопровождаются различными формами катаракты (HspB4, HspB5), миофибриллярной миопатии и некоторыми формами кардиомиопатии (HspB5) или дистальной невропатии (HspB1). Указанный остаток играет ключевую роль в межсубъединичных контактах соседних мономеров малых белков теплового шока, обеспечивая формирование солевого мостика с определенными отрицательно заряженными остатками соседнего мономера [84, 108]. Мутация K141E и особенно двойная мутация K137E+K141E приводили к дестабилизации структуры HspB8 и к увеличению чувствительности к протеолизу [109, 110]. Помимо этого, мутация K141E приводит к заметному уменьшению шапероноподобной активности HspB8 с некоторыми модельными белками-субстратами [110].

Экспрессия флуоресцентных химер мутантных форм HspB8 в COS клетках сопровождалась накоплением агрегатов [89]. Однако, судя по всему, изменение растворимости и склонность к агрегации не являются единственной причиной, вызывающей патологические явления. При экспрессии в первичных мотонейронах не было обнаружено формирования агрегатов мутантов HspB8 и, тем не менее, экспрессия мутантов HspB8 в этом случае сопровождалась дегенерацией нейритов [111]. Любопытно отметить, что этот эффект был высоко специфичным и наблюдался только в мотонейронах и полностью отсутствовал в первичных глиальных клетках, а также в сенсорных и кортикальных нейронах [111]. Описанные эффекты могут быть связаны с тем, что мутации могут приводить к изменению взаимодействия HspB8 с какими-то специальными белками-мишенями в составе клетки. Оказалось, что мутации HspB8 сопровождаются уменьшением потенциала на мембране митохондрий и ингибированием автофагии, обеспечивающей избирательный протеолиз неправильно свернутых белков [112–114]. Ингибирование автофагии может быть связано как минимум с двумя разными процессами. Во-первых, мутация остатка K141 приводит к ослаблению взаимодействия HspB8 со специальным адаптерным белком Bag3, участвующим в регуляции автофагии [115, 116]. Во-вторых, мутация HspB8 нарушает доставку лизосом к автофагосомам [113], т.е. другими словами влияет на внутриклеточные транспортные процессы. Другим потенциальным внутриклеточным партнером HspB8 может являться Ddx20/Gemin3, РНК-хеликаза, способная связываться со специальным белком, обеспечивающим выживание моторных нейронов (survival-of-motor-neurons protein, SMN protein). Оба белка

(Ddx20/Gemin3 и SMN) участвуют в формировании сплайсосом и процессинге пре-мРНК [117]. Мутантные формы HspB8 особенно прочно связываются с Ddx20/Gemin3. При этом, если связывание HspB8 с Ddx20/Gemin3 не зависит от присутствия РНКазы, то связывание Ddx20/Gemin3 с мутантными формами HspB8 оказывается зависимым от РНКазы [118]. Это позволяет предполагать, что HspB8 дикого типа в комплексе с Ddx20/Gemin3 каким-то образом способен защищать РНК от действия РНКазы, в то время как мутантные формы HspB8 оказываются лишенными этой способности. Наконец, помимо вышеуказанных белков, потенциальными белками-партнерами HspB8 могут быть другие малые белки теплового шока, экспрессируемые в клетке. Данные литературы [82] указывают на то, что мутантные формы HspB8 образуют очень прочные комплексы с HspB1 и  $\alpha$ B-кристаллином. Такого рода прочные взаимодействия могут приводить к тому, что HspB1 и  $\alpha$ B-кристаллин будут целиком задействованы во взаимодействии с мутантными формами HspB8 и не смогут участвовать в нормальных процессах, протекающих в клетке. Все это также может быть причиной возникновения различных патологических процессов.

## VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Различные формы болезни Шарко-Мари-Ту второго типа и дистальной моторной невропатии представляют собой широко распространенную группу невропатий с различной этиологией, различным временем возникновения и различной тяжестью заболевания. Наиболее вероятной причиной возникновения этих заболеваний является нарушение внутриклеточных процессов транспорта, которые могут быть связаны с повреждением специальных моторных или адаптерных белков, участвующих в процессах перемещения органелл внутри клеток, повреждениями цитоскелета или нарушением нормального энергетического обеспечения транспортных процессов. Транспортные процессы обеспечиваются большим количеством разнообразных белков и повреждение структуры или изменение внутриклеточного распределения этих белков может приводить к тяжелым последствиям. Малые белки теплового шока обеспечивают протеостаз, другими словами, контролируют правильное сворачивание белков и принимают участие как в ренатурации частично денатурированных белков, так и в элиминации неспособных к ренатурации белков. В связи с тем, что малые белки теплового шока взаимодействуют с огромным количеством разных белков и участвуют в

контроле многих внутриклеточных процессов, точечные мутации малых белков теплового шока коррелируют с возникновением различных форм невропатий. Мутации могут приводить либо к потере определенных полезных свойств (например, к уменьшению шапероноподобной активности, неспособности взаимодействовать с определенными белками-мишенями или белками-партнерами) или, наоборот, способствовать приобретению каких-либо вредных свойств (например, усиленному взаимодействию со старыми или новыми белками-партнерами или образованию склонных к агрегации или, наоборот, склонных к облегченной диссоциации олигомеров). Четвертичная структура малых белков теплового шока достаточно сложна, поэтому точечные мутации могут вызывать очень разнообразные изменения как в олигомерном состоянии этих белков, так и в их способности взаимодействовать с белками-партнерами. Поэтому для разработки методов лечения врожденных заболеваний предстоит проводить детальное исследование каждой конкретной мутации. При этом можно рассчитывать на успех только в том случае, если такое исследование будет комплексным и будет проводиться как на уровне отдельных белков, так и на уровне клеток и тканей.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Maaroufi, H. and Tanguay, R.M. (2013) Analysis and phylogeny of small heat shock proteins from marine viruses and their cyanobacteria host, *PLoS ONE*, **8**, e81207.
2. Kriehuber, T., Rattei, T., Weinmaier, T., Bepperling, A., Haslbeck, M., and Buchner, J. (2010) Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins, *FASEB J.*, **24**, 3633–3642.
3. Kappe, G., Boelens, W.C., and de Jong, W.W. (2010) Why proteins without an alpha-crystallin domain should not be included in the human small heat shock protein family HSPB, *Cell Stress Chaperones*, **15**, 457–461.
4. Mymrikov, E.V., Seit-Nebi, A.S., and Gusev, N.B. (2011) Large potentials of small heat shock proteins, *Physiol. Rev.*, **91**, 1123–1159.
5. Basha, E., O'Neill, H., and Vierling, E. (2012) Small heat shock proteins and alpha-crystallins: dynamic proteins with flexible functions, *Trends Biochem. Sci.*, **37**, 106–117.
6. Treweek, T.M., Meehan, S., Ecroyd, H., and Carver, J.A. (2015) Small heat-shock proteins: important players in regulating cellular proteostasis, *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 429–451.
7. Peschek, J., Braun, N., Franzmann, T.M., Georgalis, Y., Haslbeck, M., Weinkauff, S., and Buchner, J. (2009) The eye lens chaperone alpha-crystallin forms defined globular assemblies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 13272–13277.
8. Peschek, J., Braun, N., Rohrberg, J., Back, K.C., Kriehuber, T., Kastenmuller, A., Weinkauff, S., and Buchner, J. (2013) Regulated structural transitions unleash the chaperone activity of alphaB-crystallin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110**, E3780–3789.

9. Hochberg, G.K. and Benesch, J.L. (2014) Dynamical structure of alphaB-crystallin, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **115**, 11–20.
10. Mymrikov, E.V., Seit-Nebi, A.S., and Gusev, N.B. (2012) Hetero-oligomeric complexes of human small heat shock proteins, *Cell Stress Chaperones*, **17**, 157–169.
11. Arrigo, A.P. (2013) Human small heat shock proteins: protein interactomes of homo- and hetero-oligomeric complexes: an update, *FEBS Lett.*, **587**, 1959–1969.
12. Kim, K.K., Kim, R., and Kim, S.H. (1998) Crystal structure of a small heat-shock protein, *Nature*, **394**, 596–599.
13. van Montfort, R.L., Basha, E., Friedrich, K.L., Slingsby, C., and Vierling, E. (2001) Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein, *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 1026–1030.
14. Stamler, R., Kappe, G., Boelens, W., and Slingsby, C. (2005) Wrapping the alpha-crystallin domain fold in a chaperone assembly, *J. Mol. Biol.*, **353**, 68–79.
15. Hanazono, Y., Takeda, K., Yohda, M., and Miki, K. (2012) Structural studies on the oligomeric transition of a small heat shock protein, StHsp14.0, *J. Mol. Biol.*, **422**, 100–108.
16. Hilario, E., Martin, F.J., Bertolini, M.C., and Fan, L. (2011) Crystal structures of *Xanthomonas* small heat shock protein provide a structural basis for an active molecular chaperone oligomer, *J. Mol. Biol.*, **408**, 74–86.
17. 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) Crystal structures of truncated alphaA and alphaB crystallins reveal structural mechanisms of polydispersity important for eye lens function, *Protein Sci.*, **19**, 1031–1043.
18. Bagneris, C., Bateman, O.A., Naylor, C.E., Cronin, N., Boelens, W.C., Keep, N.H., and Slingsby, C. (2009) Crystal structures of alpha-crystallin domain dimers of alphaB-crystallin and Hsp20, *J. Mol. Biol.*, **392**, 1242–1252.
19. Clark, A.R., Lubsen, N.H., and Slingsby, C. (2012) sHSP in the eye lens: crystallin mutations, cataract and proteostasis, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **44**, 1687–1697.
20. Baranova, E.V., Weeks, S.D., Beelen, S., Bukach, O.V., Gusev, N.B., and Strelkov, S.V. (2011) Three-dimensional structure of alpha-crystallin domain dimers of human small heat shock proteins HSPB1 and HSPB6, *J. Mol. Biol.*, **411**, 110–122.
21. Weeks, S.D., Baranova, E.V., Heirbaut, M., Beelen, S., Shkumatov, A.V., Gusev, N.B., and Strelkov, S.V. (2014) Molecular structure and dynamics of the dimeric human small heat shock protein HSPB6, *J. Struct. Biol.*, **185**, 342–354.
22. Kappe, G., Franck, E., Verschuure, P., Boelens, W.C., Leunissen, J.A., and de Jong, W.W. (2003) The human genome encodes 10 alpha-crystallin-related small heat shock proteins: HspB1–10, *Cell Stress Chaperones*, **8**, 53–61.
23. Fontaine, J.M., Rest, J.S., Welsh, M.J., and Benndorf, R. (2003) The sperm outer dense fiber protein is the 10th member of the superfamily of mammalian small stress proteins, *Cell Stress Chaperones*, **8**, 62–69.
24. Taylor, R.P. and Benjamin, I.J. (2005) Small heat shock proteins: a new classification scheme in mammals, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **38**, 433–444.
25. Slingsby, C. and Wistow, G.J. (2014) Functions of crystallins in and out of lens: roles in elongated and post-mitotic cells, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **115**, 52–67.
26. Lutsch, G., Vetter, R., Offhaus, U., Wieske, M., Grone, H.J., Klemenz,

- R., Schimke, I., Stahl, J., and Bendorff, R. (1997) Abundance and location of the small heat shock proteins HSP25 and alphaB-crystallin in rat and human heart, *Circulation*, **96**, 3466–3476.
27. Verschuure, P., Tatard, C., Boelens, W.C., Grongnet, J.F., and David, J.C. (2003) Expression of small heat shock proteins HspB2, HspB8, Hsp20 and cvHsp in different tissues of the perinatal developing pig, *Eur. J. Cell Biol.*, **82**, 523–530.
28. Inaguma, Y., Hasegawa, K., Kato, K., and Nishida, Y. (1996) cDNA cloning of a 20-kDa protein (p20) highly homologous to small heat shock proteins: developmental and physiological changes in rat hindlimb muscles, *Gene*, **178**, 146–150.
29. Bartelt-Kirbach, B. and Golenhofen, N. (2014) Reaction of small heat-shock proteins to different kinds of cellular stress in cultured rat hippocampal neurons, *Cell Stress Chaperones*, **19**, 146–153.
30. Kato, K., Shinohara, H., Goto, S., Inaguma, Y., Morishita, R., and Asano, T. (1992) Copurification of small heat shock protein with alpha B crystallin from human skeletal muscle, *J. Biol. Chem.*, **267**, 7718–7725.
31. Hilton, G.R., Lioe, H., Stengel, F., Baldwin, A.J., and Benesch, J.L. (2013) Small Heat-Shock Proteins: Paramedics of the Cell, *Top. Curr. Chem.* **328**, 69–98.
32. Mymrikov, E.V., Bukach, O.V., Seit-Nebi, A.S., and Gusev, N.B. (2010) The pivotal role of the beta 7 strand in the intersubunit contacts of different human small heat shock proteins, *Cell Stress Chaperones*, **15**, 366–377.
33. Bukach, O.V., Seit-Nebi, A.S., Marston, S.B., and Gusev, N.B. (2004) Some properties of human small heat shock protein Hsp20 (HspB6), *Eur. J. Biochem.*, **271**, 291–302.
34. Carra, S., Sivilotti, M., Chavez Zobel, A.T., Lambert, H., and Landry, J. (2005) HspB8, a small heat shock protein mutated in human neuromuscular disorders, has in vivo chaperone activity in cultured cells, *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 1659–1669.
35. Boncoraglio, A., Minoia, M., and Carra, S. (2012) The family of mammalian small heat shock proteins (HSPBs): implications in protein deposit diseases and motor neuropathies, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **44**, 1657–1669.
36. Carra, S., Seguin, S.J., Lambert, H., and Landry, J. (2008) HspB8 chaperone activity toward poly(Q)-containing proteins depends on its association with Bag3, a stimulator of macroautophagy, *J. Biol. Chem.*, **283**, 1437–1444.
37. Zhang, H., Rajasekaran, N.S., Orosz, A., Xiao, X., Rechsteiner, M., and Benjamin, I.J. (2010) Selective degradation of aggregate-prone CryAB mutants by HSPB1 is mediated by ubiquitin-proteasome pathways, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **49**, 918–930.
38. Parcellier, A., Brunet, M., Schmitt, E., Col, E., Didelot, C., Hammann, A., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Khochbin, S., Solary, E., and Garrido, C. (2006) HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27Kip1 and helps S-phase re-entry in stressed cells, *FASEB J.*, **20**, 1179–1181.
39. Arrigo, A.P. (2007) The cellular «networking» of mammalian Hsp27 and its functions in the control of protein folding, redox state and apoptosis, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **594**, 14–26.
40. Wyttenbach, A., Sauvageot, O., Carmichael, J., Diaz-Latoud, C., Arrigo, A.P., and Rubinsztein, D.C. (2002) Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin, *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 1137–1151.

41. Ghosh, J.G., Houck, S.A., and Clark, J.I. (2007) Interactive domains in the molecular chaperone human alphaB crystallin modulate microtubule assembly and disassembly, *PLoS ONE*, **2**, e498.
42. Clarke, J.P. and Mearow, K.M. (2013) Cell Stress Promotes the Association of Phosphorylated HspB1 with F-Actin, *PLoS ONE*, **8**, e68978.
43. Wettstein, G., Bellaye, P.S., Micheau, O., and Bonniaud, P. (2012) Small heat shock proteins and the cytoskeleton: An essential interplay for cell integrity?, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **44**, 1680–1686.
44. Elliott, J.L., Der Perng, M., Prescott, A.R., Jansen, K.A., Koenderink, G.H., and Quinlan, R.A. (2013) The specificity of the interaction between alphaB-crystallin and desmin filaments and its impact on filament aggregation and cell viability, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **368**, 20120375.
45. Pivovarova, A.V., Chebotareva, N.A., Chernik, I.S., Gusev, N.B., and Levitsky, D.I. (2007) Small heat shock protein Hsp27 prevents heat-induced aggregation of F-actin by forming soluble complexes with denatured actin, *FEBS J.*, **274**, 5937–5948.
46. 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) The small heat shock protein, HSPB6, in muscle function and disease, *Cell Stress Chaperones*, **15**, 1–11.
47. Bakthisaran, R., Tangirala, R., and Rao, C.M. (2014) Small heat shock proteins: role in cellular functions and pathology, *Biochim. Biophys. Acta*, **1854**, 291–319.
48. Acunzo, J., Katsogiannou, M., and Rocchi, P. (2012) Small heat shock proteins HSP27 (HspB1), alphaB-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **44**, 1622–1631.
49. Paul, C., Simon, S., Gibert, B., Virot, S., Manero, F., and Arrigo, A.P. (2010) Dynamic processes that reflect anti-apoptotic strategies set up by HspB1 (Hsp27), *Exp. Cell Res.*, **316**, 1536–1552.
50. Laskowska, E., Matuszewska, E., and Kuczynska-Wisnik, D. (2010) Small heat shock proteins and protein-misfolding diseases, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **11**, 146–157.
51. Datskevich, P.N., Nefedova, V.V., Sudnitsyna, M.V., and Gusev, N.B. (2012) Mutations of small heat shock proteins and human congenital diseases, *Biochemistry*, **77**, 1500–1514.
52. Benndorf, R., Hayess, K., Ryazan-tsev, S., Wieske, M., Behlke, J., and Lutsch, G. (1994) Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity, *J. Biol. Chem.*, **269**, 20780–20784.
53. Bucci, C., Bakke, O., and Progida, C. (2012) Charcot-Marie-Tooth disease and intracellular traffic, *Prog. Neurobiol.*, **99**, 191–225.
54. Patzko, A. and Shy, M.E. (2011) Update on Charcot-Marie-Tooth disease, *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, **11**, 78–88.
55. DiVincenzo, C., Elzinga, C.D., Medeiros, A.C., Karbassi, I., Jones, J.R., Evans, M.C., Braastad, C.D., Bishop, C.M., Jaremko, M., Wang, Z., Liaquat, K., Hoffman, C.A., York, M.D., Batish, S.D., Lupski, J.R., and Higgins, J.J. (2014) The allelic spectrum of Charcot-Marie-Tooth disease in over 17,000 individuals with neuropathy, *Molecular genetics & genomic medicine*, **2**, 522–529.
56. Gentil, B.J. and Cooper, L. (2012) Molecular basis of axonal dysfunction and traffic impairments in CMT, *Brain Res. Bull.*, **88**, 444–453.
57. Timmerman, V., Strickland, A.V., and Zuchner, S. (2014) Genetics of

- Charcot-Marie-Tooth (CMT) Disease within the Frame of the Human Genome Project Success, *Genes*, **5**, 13–32.
58. Jerath, N.U. and Shy, M.E. (2014) Hereditary motor and sensory neuropathies: Understanding molecular pathogenesis could lead to future treatment strategies, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1852**, 667–678.
59. Weedon, M.N., Hastings, R., Caswell, R., Xie, W., Paszkiewicz, K., Antoniadi, T., Williams, M., King, C., Greenhalgh, L., Newbury-Ecob, R., and Ellard, S. (2011) Exome sequencing identifies a DYNC1H1 mutation in a large pedigree with dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease, *Am. J. Hum. Genet.*, **89**, 308–312.
60. Puls, I., Jonnakuty, C., LaMonte, B.H., Holzbaur, E.L., Tokito, M., Mann, E., Floeter, M.K., Bidus, K., Drayna, D., Oh, S.J., Brown, R.H., Jr., Ludlow, C.L., and Fischbeck, K.H. (2003) Mutant dynactin in motor neuron disease, *Nat. Genet.*, **33**, 456–456.
61. Zhao, C., Takita, J., Tanaka, Y., Setou, M., Nakagawa, T., Takeda, S., Yang, H.W., Terada, S., Nakata, T., Takel, Y., Saito, M., Tsuji, S., Hayashi, Y., and Hirokawa, N. (2001) Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta, *Cell*, **105**, 587–597.
62. Wang, T., Ming, Z., Xiaochun, W., and Hong, W. (2011) Rab7: role of its protein interaction cascades in endo-lysosomal traffic, *Cell. Signal.*, **23**, 516–521.
63. Verhoeven, K., De Jonghe, P., Coen, K., Verpoorten, N., Auer-Grumbach, M., Kwon, J.M., FitzPatrick, D., Schmedding, E., De Vriendt, E., Jacobs, A., Van Gerwen, V., Wagner, K., Hartung, H.P., and Timmerman, V. (2003) Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy, *Am. J. Hum. Genet.*, **72**, 722–727.
64. De Jonghe, P., Mersivanova, I., Nelis, E., Del Favero, J., Martin, J.J., Van Broeckhoven, C., Evgrafov, O., and Timmerman, V. (2001) Further evidence that neurofilament light chain gene mutations can cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2E, *Ann. Neurol.*, **49**, 246–249.
65. Jordanova, A., De Jonghe, P., Boerkoel, C.F., Takashima, H., De Vriendt, E., Ceuterick, C., Martin, J.J., Butler, I.J., Mancias, P., Pappasozomenos, S., Terespolsky, D., Potocki, L., Brown, C.W., Shy, M., Rita, D.A., Tournev, I., Kremensky, I., Lupski, J.R., and Timmerman, V. (2003) Mutations in the neurofilament light chain gene (NEFL) cause early onset severe Charcot-Marie-Tooth disease, *Brain*, **126**, 590–597.
66. Mersivanova, I.V., Perepelov, A.V., Polyakov, A.V., Sitnikov, V.F., Dadali, E.L., Oparin, R.B., Petrin, A.N., and Evgrafov, O.V. (2000) A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene, *Am. J. Hum. Genet.*, **67**, 37–46.
67. Benndorf, R., Martin, J.L., Kosakovsky Pond, S.L., and Wertheim, J.O. (2014) Neuropathy- and myopathy-associated mutations in human small heat shock proteins: Characteristics and evolutionary history of the mutation sites, *Mutat. Res.* doi: 10.1016/j.mrrev.2014.02.004.
68. Houlden, H., Laura, M., Wavrant-De Vrieze, F., Blake, J., Wood, N., and Reilly, M.M. (2008) Mutations in the HSP27 (HSPB1) gene cause dominant, recessive, and sporadic distal HMN/CMT type 2, *Neurology*, **71**, 1660–1668.
69. Capponi, S., Geroldi, A., Fossa, P., Grandis, M., Ciotti, P., Gulli, R., Schenone, A., Mandich, P., and Bellone, E. (2011) HSPB1 and HSPB8 in inherited neuropathies:

- study of an Italian cohort of dHMN and CMT2 patients, *J. Peripher. Nerv. Syst.*, **16**, 287–294.
- 69a. Muranova, L.K., Weeks, S.D., Strelkov, S.V., Gusev, N.B. (2015) Characterization of mutants of human small heat shock protein HspB1 carrying replacements in the N-terminal domain and associated with hereditary motor neuron diseases, *PLoS ONE*, **10**, e0126248.
70. James, P.A., Rankin, J., and Talbot, K. (2008) Asymmetrical late onset motor neuropathy associated with a novel mutation in the small heat shock protein HSPB1 (HSP27), *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **79**, 461–463.
71. Nefedova, V.V., Sudnitsyna, M.V., Strelkov, S.V., and Gusev, N.B. (2013) Structure and properties of G84R and L99M mutants of human small heat shock protein HspB1 correlating with motor neuropathy, *Arch. Biochem. Biophys.*, **538**, 16–24.
72. Evgrafov, O.V., Mersiyanova, 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) Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy, *Nat. Genet.*, **36**, 602–606.
73. Tang, B., Liu, X., Zhao, G., Luo, W., Xia, K., Pan, Q., Cai, F., Hu, Z., Zhang, C., Chen, B., Zhang, F., Shen, L., Zhang, R., and Jiang, H. (2005) Mutation analysis of the small heat shock protein 27 gene in chinese patients with Charcot-Marie-Tooth disease, *Arch. Neurol.*, **62**, 1201–1207.
74. 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., Helderman-van den Enden, A.T., Wokke, J.H., Nelis, E., De Jonghe, P., and Timmerman, V. (2008) Relative contribution of mutations in genes for autosomal dominant distal hereditary motor neuropathies: a genotype-phenotype correlation study, *Brain*, **131**, 1217–1227.
75. Stancanelli, C., Fabrizi, G.M., Ferrarini, M., Cavallaro, T., Taioli, F., Di Leo, R., Russo, M., Gentile, L., Toscano, A., Vita, G., and Mazzeo, A. (2014) Charcot-Marie-Tooth 2F: phenotypic presentation of the Arg136Leu HSP27 mutation in a multigenerational family, *Neurol. Sci.* doi: 10.1007/s10072-014-2050-8.
76. 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) Increased monomerization of mutant HSPB1 leads to protein hyperactivity in Charcot-Marie-Tooth neuropathy, *J. Biol. Chem.*, **285**, 12778–12786.
77. Holmgren, A., Bouhy, D., De Winter, V., Asselbergh, B., Timmermans, J.P., Irobi, J., and Timmerman, V. (2013) Charcot-Marie-Tooth causing HSPB1 mutations increase Cdk6-mediated phosphorylation of neurofilaments, *Acta Neuropathol*, **126**, 93–108.
78. Srivastava, A.K., Renusch, S.R., Naiman, N.E., Gu, S., Sneh, A., Arnold, W.D., Sahenk, Z., and Kolb, S.J. (2012) Mutant HSPB1 overexpression in neurons is sufficient to cause age-related motor neuropathy in mice, *Neurobiol. Dis.*, **47**, 163–173.

79. 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) Small heat-shock protein HSPB1 mutants stabilize microtubules in Charcot-Marie-Tooth neuropathy, *J. Neurosci.*, **31**, 15320–15328.
80. d'Ydewalle, C., Krishnan, J., Chiheb, D.M., Van Damme, P., Irobi, J., Kozikowski, A.P., Vanden Berghe, P., Timmerman, V., Robberecht, W., and Van Den Bosch, L. (2011) HDAC6 inhibitors reverse axonal loss in a mouse model of mutant HSPB1-induced Charcot-Marie-Tooth disease, *Nat. Med.*, **17**, 968–974.
81. Almeida-Souza, L., Timmerman, V., and Janssens, S. (2011) Microtubule dynamics in the peripheral nervous system: A matter of balance, *Bioarchitecture*, **1**, 267–270.
82. Fontaine, J.M., Sun, X., Hoppe, A.D., Simon, S., Vicart, P., Welsh, M.J., and Benndorf, R. (2006) Abnormal small heat shock protein interactions involving neuropathy-associated HSP22 (HSPB8) mutants, *FASEB J.*, **20**, 2168–2170.
83. Ikeda, Y., Abe, A., Ishida, C., Takahashi, K., Hayasaka, K., and Yamada, M. (2009) A clinical phenotype of distal hereditary motor neuronopathy type II with a novel HSPB1 mutation, *J. Neurol. Sci.*, **277**, 9–12.
84. Nefedova, V.V., Datskevich, P.N., Sudnitsyna, M.V., Strelkov, S.V., and Gusev, N.B. (2013) Physicochemical properties of R140G and K141Q mutants of human small heat shock protein HspB1 associated with hereditary peripheral neuropathies, *Biochimie*, **95**, 1582–1592.
85. Hansen, L., Yao, W., Eiberg, H., Kjaer, K.W., Baggesen, K., Hejtmancik, J.F., and Rosenberg, T. (2007) Genetic heterogeneity in microcornea-cataract: five novel mutations in CRYAA, CRYGD, and GJA8, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **48**, 3937–3944.
86. Litt, M., Kramer, P., LaMorticella, D.M., Murphey, W., Lovrien, E.W., and Weleber, R.G. (1998) Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystallin gene CRYAA, *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 471–474.
87. 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) A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy, *Nat. Genet.*, **20**, 92–95.
88. Inagaki, N., Hayashi, T., Arimura, T., Koga, Y., Takahashi, M., Shibata, H., Teraoka, K., Chikamori, T., Yamashina, A., and Kimura, A. (2006) Alpha B-crystallin mutation in dilated cardiomyopathy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **342**, 379–386.
89. 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 Vandekerckhove, J., Van Broeckhoven, C., Gettemans, J., De Jonghe, P., and Timmerman, V. (2004) Hot-spot residue in small heat-shock protein 22 causes distal motor neuropathy, *Nat. Genet.*, **36**, 597–601.
90. Chalova, A.S., Sudnitsyna, M.V., Strelkov, S.V., and Gusev, N.B. (2014) Characterization of human small heat shock protein HspB1 that carries C-terminal domain mutations associated with hereditary motor neuron diseases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1844**, 2116–2126.

91. 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) The mutational spectrum in a cohort of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 among the Han Chinese in Taiwan, *PLoS ONE*, **6**, e29393.
92. Luigetti, M., Fabrizi, G.M., Madia, F., Ferrarini, M., Conte, A., Del Grande, A., Tasca, G., Tonali, P.A., and Sabatelli, M. (2010) A novel HSPB1 mutation in an Italian patient with CMT2/dHMN phenotype, *J. Neurol. Sci.*, **298**, 114–117.
93. Kijima, K., Numakura, C., Goto, T., Takahashi, T., Otagiri, T., Umetsu, K., and Hayasaka, K. (2005) Small heat shock protein 27 mutation in a Japanese patient with distal hereditary motor neuropathy, *J. Hum. Genet.*, **50**, 473–476.
94. Ackerley, S., James, P.A., Kalli, A., French, S., Davies, K.E., and Talbot, K. (2006) A mutation in the small heat-shock protein HSPB1 leading to distal hereditary motor neuropathy disrupts neurofilament assembly and the axonal transport of specific cellular cargoes, *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 347–354.
95. Delbecq, S.P., Jehle, S., and Klevit, R. (2012) Binding determinants of the small heat shock protein, alphaB-crystallin: recognition of the 'IxI' motif, *EMBO J.*, **31**, 4587–4594.
96. Delbecq, S.P. and Klevit, R.E. (2013) One size does not fit all: the oligomeric states of alphaB crystallin, *FEBS Lett.*, **587**, 1073–1080.
97. Hochberg, G.K., Ecroyd, H., Liu, C., Cox, D., Cascio, D., Sawaya, M.R., Collier, M.P., Stroud, J., Carver, J.A., Baldwin, A.J., Robinson, C.V., Eisenberg, D.S., Benesch, J.L., and Laganowsky, A. (2014) The structured core domain of alphaB-crystallin can prevent amyloid fibrillation and associated toxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **111**, E1562–1570.
98. Treweek, T.M., Rekas, A., Walker, M.J., and Carver, J.A. (2010) A quantitative NMR spectroscopic examination of the flexibility of the C-terminal extensions of the molecular chaperones, alphaA- and alphaB-crystallin, *Exp. Eye Res.* **91**, 691–699.
99. Lindner, R.A., Carver, J.A., Ehrnsperger, M., Buchner, J., Esposito, G., Behlke, J., Lutsch, G., Kotlyarov, A., and Gaestel, M. (2000) Mouse Hsp25, a small shock protein. The role of its C-terminal extension in oligomerization and chaperone action, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1923–1932.
100. Morris, A.M., Treweek, T.M., Aquilina, J.A., Carver, J.A., and Walker, M.J. (2008) Glutamic acid residues in the C-terminal extension of small heat shock protein 25 are critical for structural and functional integrity, *FEBS J.*, **275**, 5886–5898.
101. 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) Mutant small heat shock protein B3 causes motor neuropathy: utility of a candidate gene approach, *Neurology*, **74**, 502–506.
102. Asthana, A., Raman, B., Ramakrishna, T., and Rao, C.M. (2012) Structural Aspects and Chaperone Activity of Human HspB3: Role of the “C-Terminal Extension”, *Cell Biochem. Biophys.* **64**, 61–72.
103. den Engelsman, J., Boros, S., Dankers, P.Y., Kamps, B., Vree Egberts, W.T., Bode, C.S., Lane, L.A., Aquilina, J.A., Benesch, J.L., Robinson, C.V., de Jong, W.W., and Boelens, W.C. (2009) The small heat-shock proteins HSPB2 and HSPB3 form well-defined heterooligomers in a unique 3 to 1 subunit ratio, *J. Mol. Biol.*, **393**, 1022–1032.

104. Prabhu, S., Raman, B., Ramakrishna, T., and Rao Ch, M. (2012) HspB2/myotonic dystrophy protein kinase binding protein (MKBP) as a novel molecular chaperone: structural and functional aspects, *PLoS ONE*, **7**, e29810.
105. Hu, Z., Yang, B., Lu, W., Zhou, W., Zeng, L., Li, T., and Wang, X. (2008) HSPB2/MKBP, a novel and unique member of the small heat-shock protein family, *J. Neurosci. Res.*, **86**, 2126–2133.
106. 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) Small heat-shock protein 22 mutated in autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2L, *Hum. Genet.*, **116**, 222–224.
107. Nakhro, K., Park, J.M., Kim, Y.J., Yoon, B.R., Yoo, J.H., Koo, H., Choi, B.O., and Chung, K.W. (2013) A novel Lys141Thr mutation in small heat shock protein 22 (HSPB8) gene in Charcot-Marie-Tooth disease type 2L, *Neuromuscul. Disord.*, **23**, 656–663.
108. Clark, A.R., Naylor, C.E., Bagneris, C., Keep, N.H., and Slingsby, C. (2011) Crystal structure of R120G disease mutant of human alphaB-crystallin domain dimer shows closure of a groove, *J. Mol. Biol.*, **408**, 118–134.
109. Kasakov, A.S., Bukach, O.V., Seit-Nebi, A.S., Marston, S.B., and Gusev, N.B. (2007) Effect of mutations in the beta6–beta7 loop on the structure and properties of human small heat shock protein HSP22 (HspB8, H11), *FEBS J.*, **274**, 5628–5642.
110. Kim, M.V., Kasakov, A.S., Seit-Nebi, A.S., Marston, S.B., and Gusev, N.B. (2006) Structure and properties of K141E mutant of small heat shock protein HSP22 (HspB8, H11) that is expressed in human neuromuscular disorders, *Arch. Biochem. Biophys.*, **454**, 32–41.
111. 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) Mutant HSPB8 causes motor neuron-specific neurite degeneration, *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 3254–3265.
112. 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) Mutant HSPB8 causes protein aggregates and a reduced mitochondrial membrane potential in dermal fibroblasts from distal hereditary motor neuropathy patients, *Neuromuscul. Disord.*, **22**, 699–711.
113. Kwok, A.S., Phadwal, K., Turner, B.J., Oliver, P.L., Raw, A., Simon, A.K., Talbot, K., and Agashe, V.R. (2011) HspB8 mutation causing hereditary distal motor neuropathy impairs lysosomal delivery of autophagosomes, *J. Neurochem.*, **119**, 1156–1161.
114. Vicario, M., Skaper, S.D., and Negro, A. (2014) The small heat shock protein HspB8: role in nervous system physiology and pathology, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **13**, 886–895.
115. Carra, S., Boncoraglio, A., Kanon, B., Brunsting, J.F., Minoia, M., Rana, A., Vos, M.J., Seidel, K., Sibon, O.C., and Kampinga, H.H. (2010) Identification of the *Drosophila* ortholog of HSPB8: implication of HSPB8 loss of function in protein folding diseases, *J. Biol. Chem.*, **285**, 37811–37822.
116. Shemetov, A.A. and Gusev, N.B. (2011) Biochemical characterization of small heat shock protein

- HspB8 (Hsp22)-Bag3 interaction, *Arch. Biochem. Biophys.*, **513**, 1–9.
117. Charroux, B., Pellizzoni, L., Perkinson, R.A., Shevchenko, A., Mann, M., and Dreyfuss, G. (1999) Gemin3: A novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems, *J. Cell Biol.*, **147**, 1181–1194.
118. 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) Abnormal interaction of motor neuropathy-associated mutant HspB8 (Hsp22) forms with the RNA helicase Ddx20 (gemin3), *Cell Stress Chaperones*, **15**, 567–582.