

Молекулярный шаперон Hsp90: структура, функции и участие в кардиоваскулярной патологии

И. В. Крупская

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03680

i.v.kroupskaya@imbg.org.ua

Обзор посвящен анализу структурных и функциональных свойств молекулярного шаперона Hsp90. Hsp90 является представителем широко распространенного семейства белков теплового шока. Он обнаружен в бактериях и в эукариотах, но отсутствует в архебактериях, служит также одним из ключевых регуляторов многочисленных сигнальных путей, определяющих рост и развитие клеток, апоптоз, индукцию аутоиммунных реакций и прогрессию сердечной недостаточности. Полная функциональная активность этого белка проявляется в комплексе с другими молекулярными шаперонами и кошаперонами. Молекулярные взаимодействия между шаперонами, различными сигнальными белками и белками-партнерами критичны для нормального функционирования сигнальных путей, а нарушение их вызывает изменения в физиологии клетки вплоть до ее гибели.

Ключевые слова: Hsp90, домен, кристаллическая структура, сигнальный путь, апоптоз.

Введение. При воздействии на клетки организмов различными физико-химическими факторами чаще всего повреждаются белки – нарушается их структура и изменяются функции. Чтобы справиться с повреждениями белковых структур, клетка должна активировать аппарат специфической защиты. Исследования процессов жизнедеятельности клетки и сворачивания белков *in vivo* выявили ряд клеточных компонентов, вовлеченных либо в катализ процесса сворачивания белков, либо в регуляцию распределения вновь синтезированных белков между альтернативными путями сворачивания и агрегации [1]. Эллисом [2] сформулирована концепция, предполагающая, что хотя сворачивание белков является спонтанным процессом, существуют критические стадии, на которых участие специальных клеточных факторов может оказаться необходимым. Роль таких факторов, названных молеку-

лярными шаперонами, состоит в обеспечении оптимальных условий для протекания процесса сворачивания белков за счет устранения «помех» или «неадекватных контактов», вследствие чего предотвращается неспецифическая агрегация вновь синтезируемых белков и обеспечивается транспорт этих белков в те внутриклеточные компартменты, где они постоянно локализуются и функционируют. Диспетчерская роль шаперонов дополняется еще и их участием в проникновении белков через мембраны.

Шапероны входят в состав большого семейства белков теплового шока (heat shock proteins (hsp)), синтез которых в клетке значительно увеличивается в ответ на тепловой шок или другие виды клеточного стресса. Вместе с тем и при нормальных условиях большинство белков этого семейства синтезируется довольно интенсивно [1].

Молекулярные шапероны Hsp90 – широко распространенное семейство белков теплового шока,

они обнаружены в бактериях и в эукариотах, но не выявлены в архебактериях [3]. Hsp90 – один из молекулярных шаперонов, находящийся в клетке в нормальных условиях в избытке. Бактериальный шаперон известен как HtpG. Клетка человека содержит четыре изоформы шаперона: цитоплазматическая форма Hsp90, синтезируемая в клетке конститутивно, и индуцибельная форма – Hsp90; в эндоплазматическом ретикулуме обнаружен аналог Hsp90 – GRP94, экспрессия которого регулируется глюкозой; митохондриальный TRAP1/hsp75 [3]. Формы Hsp90 и идентичны по аминокислотному составу на 85 %, что может быть результатом дубликации генов, произошедшей более 300 млн лет назад. Существует высокая гомология между Hsp90 низших эукариотов и человека, а также прокариотов: дрожжевой Hsp82 на 60 % идентичен человеческому Hsp90 и на 34 % – HtpG [4].

Структура Hsp90. Структура кристалла полномерного белка Hsp90 описана около 10 лет назад [4]. Вместе с тем качественные кристаллы полномерного белка Hsp90, пригодные для рентгеноструктурного анализа, до сих пор не получены, есть кристаллы отдельных доменов. Белок Hsp90 – димер, состоящий из двух идентичных субъединиц. Каждый мономер включает три независимых домена: из высококонсервативного 25 кДа N-концевого домена; 40 кДа М-домена и 12 кДа С-концевого домена [5] (рис. 1, см. вклейку). N-концевой домен присоединен к М- и С-областям так называемым «заряженным линкером» («charged linker»), являющимся вариабельным как по составу, так и по длине у различных видов и изоформ белка. Упомянутый «заряженный линкер» не несет функциональной нагрузки для Hsp90 и полностью отсутствует у Hsp75/TRAP1 и HtpG [6].

N-концевой домен. Первым крупным достижением в изучении структуры Hsp90 стало определение N-концевой области шаперона с помощью ограниченного протеолиза [5]. Изучение кристаллической структуры этой области для Hsp90 человека и дрожжей выявило, что она имеет двухслойную α -структуру сендвича [7], в котором сильно закрученный антипараллельный β -слой, состоящий из восьми полос, закрыт с одной стороны девятью α -спиралями. В центре β -спиральной части располо-

жен глубокий карман, формируемый АТФ/АДФ-связывающим сайтом. Для N-домена Hsp90 человека обнаружено, что этот карман является обязательным участком связывания гелданамицина (GA), который, связываясь с Hsp90, не дает ему образовывать комплекс с протеинкиназой и рецепторами стероидных гормонов [8]. Истинная функция N-домена и его кармана стала очевидной только при сравнении аминокислотной последовательности Hsp90 и двух АТФ-зависимых белков – топоизомеразы II (ДНК-гираза B, GyrB) и белка MutL. Определены консервативные аминокислотные остатки, вовлеченные в АТФ-связывание и его гидролиз [9]. Идентификация методом сайт-специфического мутагенеза ключевых аминокислотных остатков в N-концевой структуре Hsp90 позволила продемонстрировать, что N-концевой домен Hsp90 содержит АТФ-связывающий центр (рис. 2, а, см. вклейку) [5, 6]. А шаперонная активность Hsp90 является, таким образом, АТФ-зависимой. Впоследствии кристаллические структуры определили для N-концевых областей Hsp90 изоформы GRP94 эндоплазматического ретикулума [10] и HtpG *Escherichia coli* [11].

М-домен. После проведения структурного анализа N-концевого участка Hsp90 дрожжей и человека исследовали структуру кристалла протеолитически устойчивого так называемого среднего сегмента – М-домена дрожжей [12]. Эта структура состоит из большого β -сендвича, которым он прикреплен к N-концевому участку белка, и малого β -сендвича, прикрепленного к С-концевому домену Hsp90. β -Сендвичи соединены между собой посредством плотного кольца α -спирали (рис. 2, б, см. вклейку). Большой из двух β -сендвичей имеет складку (изгиб), подобную эквивалентной области GyrB и белка MutL, хотя существуют значительные отличия в участке, вовлеченном во взаимодействие с ДНК у MutL и GyrB. Меньший β -домен уникален, но все же имеет архитектурное сходство с большим классическим β -доме-ном. Аналогию с MutL и GyrB изучали с помощью сайт-специфического мутагенеза [9].

Обнаружено, что средний сегмент содержит основной участок взаимодействия с белками-«клиентами». Это небольшой консервативный гидро-

фобный участок с центром на Trp₃₀₀ и необычным амфипатическим выступом, образованным аминокислотными остатками 327–340. В центральной - складке -домена расположен лизин, взаимодействующий с -фосфатом АТФ, связанного с N-доменом Hsp90 [5]. Методом сайт-специфического мутагенеза выявлен и консервативный Arg₃₈₀, являющийся важным для АТФазной активности дрожжевого Hsp90 как *in vitro*, так и *in vivo*. М-домен Hsp90 является также фактором, отвечающим за дифференциацию между различными видами клиентных белков [5].

С-концевой домен. Первой была проанализирована структура кристалла С-концевого домена гомолога Hsp90, выделенного из *E. coli* – HtpG (рис. 2, в) [13]. С-концевой домен является необходимым элементом для димеризации молекулы шаперона. У HtpG С-домен – это димер, состоящий из маленьких -доменов. При сравнении первичных и вторичных структур С-концевых областей Hsp90 прокариотов и эукариотов установлено, что наиболее характерным для С-домена HtpG является отсутствие более 35 аминокислотных остатков в концевом сегменте, а именно – MEEVD-мотива, вовлеченного в связывание с так называемым TPR-доменом (tetratricopeptide repeat domain) [14]. И, тем не менее, общая структура С-домена Hsp90 как эукариотов, так и бактерий очень подобна и при отсутствии в настоящий момент структуры кристалла для эукариотного Hsp90 бактериальная структура HtpG может явиться примером хорошей рабочей модели. Исходя из вышеизложенного можно сделать вывод о том, что полная структура молекулярного шаперона Hsp90 в основном известна, но только по отдельным доменам. Имеется еще одна область с неизученной структурой – это область, которая расположена между N- и М-доменами (рис. 1, а), отличающаяся слабым консерватизмом и отсутствующая у бактериального HtpG и митохондриального белка. Размер ее варьирует от 30 до 70 аминокислотных остатков у разных видов Hsp90 и изоформ. В опытах на дрожжах как *in vitro* [15], так и *in vivo* [16] подтверждено, что этот сегмент не является критичным для функционирования Hsp90.

Конформационные изменения и АТФ-связывание. Известно, что ингибирование Hsp90 GA ин-

дуцирует его деградацию протеасомой. Поскольку шаперонная активность Hsp90 определяется балансом АТФ и АДФ и наличием белков-помощников [9], возникает вопрос, как его АТФазная активность влияет на взаимодействие с клиентными белками? Это взаимодействие рассматривали авторы работы [15] как конформационное изменение структуры Hsp90 – переход из открытой формы в закрытую. С помощью электронной микроскопии показано, что N-концевой домен вызывает конформационные изменения в С-домене при взаимодействии с АТФ: образование димерной структуры, в которой мономеры ориентированы антипараллельно друг другу в период отсутствия АТФ, и формирование кольцевой структуры в присутствии АТФ. Вместе с тем методом рентгеноструктурного анализа полноразмерной молекулы HtpG [14] выявлено наличие V-образной структуры, образующей димеры, но с параллельным расположением мономеров. Различия в конформациях при исследовании методом электронной микроскопии структуры кристалла, скорее всего, отражают значительную гибкость молекулы Hsp90 при отсутствии связывания с АТФ. Эта молекула шаперона вряд ли имеет единственную фиксированную конформацию. Ассоциация N-концевых доменов продемонстрирована несколькими различными методами с использованием Hsp90 дрожжей, цыпленка и других эукариотов. Модель конформационных переходов Hsp90 в процессе присоединения АТФ из открытой формы в закрытую свидетельствует о том, что образование димера необходимо для гидролиза АТФ, и две половины Hsp90 кооперируются между собой для достижения димерной конформации, способной гидролизовать АТФ [17]. Шаги по достижению такой конформации – это комплексный структурный процесс, в котором несколько областей Hsp90 подвергаются взаимозависимым связанным перестановкам, необходимым для любого из двух активных сайтов в димере, чтобы быть каталитически активным.

Такие данные согласуются с результатами кинетического анализа Hsp90 человека, не содержащими доказательств кооперации в классическом смысле между протомерами в димерах Hsp90 при гидролизе АТФ [18]. Понятие «функционально свя-

занный АТФазный цикл» – это определение процесса, в котором связывание АТФ стабилизирует так называемое «напряженное» конформационное и функциональное состояние Hsp90, зависящее от присутствия -фосфата АТФ, и следующий гидролиз до АДФ дестабилизирует конформацию и позволяет димеру Hsp90 релаксировать [5]. Общепринятая модель АТФазного цикла подобна таковой для димеров GyrB и MutL, в которых N-концевые домены расположены очень близко друг к другу и каждый плотно упакован по направлению к среднему сегменту той же цепи. В АТФ-связанном состоянии ДНК-гираза В формирует так называемый молекулярный зажим, который, как предполагается, закрывается вокруг цепи ДНК, а в момент гидролиза АТФ освобождает ДНК после ее суперспирализации [19, 20]. Аналогично происходит связывание пептида с Hsp90 в АТФ-связывающем центре: пептид перемещается внутрь шаперона и высвобождается в момент гидролиза АТФ [5].

Точечные мутации в Hsp90, замедляющие скорость гидролиза АТФ в норме, но никак не влияющие на АТФ-связывание, также уменьшают и эффективность АТФ-зависимого комплекса [21]. Исходя из вышеперечисленного возникает вопрос, каким образом субстрат-белок удерживается в АТФ-азном центре? Поскольку полость Hsp90, вероятно, слишком мала для посадки целого субстрата изнутри, домен в своем размере подстраивается под размер субстрата. Возможно также, что Hsp90 не включает субстрат «в объятия», а связанная область Hsp90 остается оптимально не защищенной в так называемом АТФазном зажиме.

Недавними исследованиями показано обязательное присутствие еще одного нуклеотид-связывающего сайта возле С-концевого домена Hsp90 [22]. Делеция 20 аминокислотных остатков в С-концевом домене (660–680) нарушает связывание как АТФ, так и новобиоцина. С-доменный нуклеотид-связывающий сайт может активироваться тогда, когда N-концевой сайт занят нуклеотидом или инактивирован, а также при делеции N-сайта. С другой стороны, связывание антибиотика новобиоцина на С-участке блокирует и связывание АТФ на N-сайте. Таким образом, эти два обязательных для связывания АТФ сайта работают координированно,

но, что является важным для регуляции конформационного состояния Hsp90. Пока роль этого дополнительного сайта связывания окончательно не ясна, но ингибирование его новобиоцином и цисплатином является интересным для дальнейших исследований его функций [22].

Функции Hsp90. Hsp90 функционирует *in vivo* как основной компонент большинства мультибелковых комплексов и совместно с другими факторами является одним из ключевых регуляторов многочисленных сигнальных путей, участвует в деградации белков, а также выполняет вспомогательные функции контроля, оборота и переноса различных белков и субстратов [5].

Ядерный экспорт. Многие сигнальные ответы клетки являются причиной смены локализации сигнальных белков или протенкиназ, которые перемещаются и затем активируют транскрипционные факторы, находящиеся в ядре. Фактически ничего не известно о том, как молекулы двигаются в пределах ядра. Белковая подвижность в пределах ядра может быть диффузно-лимитированной, но, скорее всего, она присуща только определенной фракции резидентных ядерных белков. Поскольку функции ядерных белков часто ограничены специфическими субъядерными компартментами, система передвижения их должна облегчаться целенаправленной доставкой. Hsp90 регулирует активность более 100 белков, вовлеченных в клеточную передачу сигналов [23]. Это так называемые «клиентные» белки Hsp90. В клеточную передачу сигналов вовлечен также мультибелковый комплекс Hsp90/Hsp70, формирующий гетерокомплексы «клиентный» белок/Hsp90 в цитоплазме и ядре.

В случае сигнальных белков, действующих как транскрипционные факторы, комплексы «клиентный» белок/Hsp90 также содержат один или несколько TPR-доменов иммунофилинов или их гомологов и связываются с TPR-доменами на Hsp90. Динамичная сборка гетерокомплексов с Hsp90 требуется для быстрого движения через цитоплазму к ядру вдоль микротубулярных треков. Роль иммунофилинов в этой системе состоит в соединении комплекса «клиентный» белок/Hsp90 с цитоплазматическим денином – моторным белком, обеспечивающим перемещение в сторону ядра. Через по-

ры ядерной мембраны (NPC) комплексы рецептор/Hsp90/иммунофилин перемещаются в ядро за счет облегченной диффузии. Несвязанные рецепторы затем распространяются по ядру, достигая дискретных ядерных центров, где и происходит связывание с хроматином. Активная сборка гетерокомплекса с Hsp90 нужна для перемещения к ядерному центру и для активного обмена факторов транскрипции между хроматином и нуклеоплазмой.

Экспорт 60S рибосомной субъединицы. Прохождение больших субстратов через NPC требует больших конформационных изменений как в NPC, так и субстрате. Hsp90 поддерживает эти структурные изменения [24].

Обнаружено, что ядерный экспорт более предпочтителен, чем ядерный импорт, в условиях клеточной гипертрофии. В гипертрофированных клетках, в частности кардиомиоцитах, количество мРНК, поставляемое в цитоплазму для белкового синтеза, значительно увеличено [25], повышен синтез белка и, следовательно, должен наблюдаться усиленный синтез рибосом. Интересно, что кардиотрофин-1 (CT-1) – фактор, способствующий стимулированию гипертрофии кардиомиоцита (заставляет клетку расти, а не дифференцироваться), также стимулирует синтез Hsp70 и Hsp90. Возросший синтез Hsp90 в гипертрофированных клетках, вероятно, предоставляет им возможность поддерживать свободный ядерный экспорт крупных субстратов [26].

Для ядерного экспорта 60S рибосомных субъединиц предполагается следующая модель. Прохождение 60S рибосомной субчастицы через NPC требует их максимального расширения пор, облегчаемого Hsp90 благодаря его функции шаперона. Далее Hsp90 способствует перемещению 60S рибосомной субчастицы от NPC к цитоскелету, «проводящая» рибосомную субъединицу через клетку так называемым транспортным цитоскелетным маршрутом к ее финальному пункту назначения. Ранее продемонстрировано, что Hsp90 способствует образованию рибосомных кристаллов внутри ядра [27], а прохождение рибосомной 60S субчастицы через NPC происходит благодаря посредничеству Hsp90. Последний помогает «раствориться» субстрату в гидрофобном окружении NPC. Принимая

во внимание огромный размер 60S рибосомных субчастиц, конечно же, их транспорт является более сложным механизмом, содержащим больше факторов и различных взаимодействий 60S рибосомных субчастиц с NPC, чем такие же процессы для малых субстратов, таких, например, как белки и тРНК.

Hsp90 и сигналы трансдукции. Большое количество белков – сигналов трансдукции клетки – являются основными субстратами Hsp90. Эти белки зависят от Hsp90, который поддерживает их в активной конформации. Нарушения в функциях Hsp90 из-за мутаций или обработки ингибиторами, такими как ансамицины, вызывают многочисленные изменения в клеточном цикле, согласующиеся с вкладом Hsp90 в сигнальные пути клетки. Например, при регуляции клеточного деления точечная мутация в Hsp90 приводит к изменению многих стадий митотического сигнального каскада, центрального цикла в течение митоза [28]. *In vivo* установлена значимость Hsp90 для функционирования рецепторов стероидных гормонов [29], некоторых тирозиновых и серин/треониновых киназ, таких как pp60/v-src, Wee-1, Cdk4, Raf и Akt [30], а также некоторых белков – синтазы окиси азота и кальциневрина [31]. Это большие и мультидоменные белки, требующие для своего функционирования стабилизующих взаимодействий с другими факторами, такими, в частности, как лиганды для рецепторов стероидных гормонов или циклины для циклин-зависимых киназ. Поскольку сигнальные белки с многочисленными регуляторными функциями часто подвергаются конформационным изменениям, их взаимодействие с Hsp90 является, скорее всего, результатом структурных изменений этих белков, что способствует узнаванию их Hsp90.

Лучше всего охарактеризован Hsp90-зависимый сигнальный путь для рецептора стероидного гормона [30]. Мономерный глюкокортикоидный рецептор (GR) и рецептор прогестерона загружаются на Hsp90 по Hsp70/Нор-зависимому механизму, связываются с Hsp90 и достигают своей гормон-связывающей конформации. Как только свернутый мономерный рецептор освобождается от шаперона, он тут же связывает соответствующий стероидный гормон, образуя димер и активируя

его. Димер становится нестабильным и снова узнается шапероном.

Рецептор прогестерона и GR использованы для реконструкции типичных мультишаперонных комплексов с очищенными Hsp90, Hsc70, Нор и p23 млекопитающих [32]. Комплекс Hsp90/Нор/Hsp70/Hsp40 получил название «фолдосома». Фолдосома переводит GR из свернутого состояния, в котором стероид-связывающий участок находится в закрытом положении и не способен взаимодействовать со стероидом, в открытое – доступное для стероида [33]. При образовании фолдосомы Нор связывается через TPR-домены с Hsp90 и Hsp70. Нор связывает димерную молекулу Hsp90, а шаперон Hsp40 является кошапероном Hsp70, который также присутствует в тетракомплексе и выполняет АТФ/ Mg^{2+} - и K^+ -зависимое открытие стероид-связывающего участка. В период, когда стероид-связывающий участок открыт, Hsp90 конвертируется в АТФ-связанную конформацию, динамически стабилизированную белком p23, в результате чего Нор освобождается от Hsp90. Образованный комплекс собран так, что несколько изменений в нем приводят к динамичному состоянию. Иммунофилины также связаны с Hsp90 через TPR-домены и при выходе Нор из комплекса иммунофилин может связывать единственный TPR-акцепторный участок на рецептор-связывающем Hsp90 димере. Некоторые Hsp70 также оставляют промежуточный комплекс.

Хотя и была продемонстрирована обусловленная гидролизом АТФ функция Hsp90 при созревании рецептора стероидного гормона, однако в условиях *in vitro* она вызывает сомнения. В случае v-src и других киназ предполагается, что Hsp90 стабилизирует незащищенные каталитические домены перед сборкой киназы в финальный сигнальный комплекс. Данный механизм концептуально относится к стероидному рецепторному пути. Вариант сигнального пути рецептора стероидного гормона экдизона (EcR – рецептор семейства гетеродимерного ретиноида X) описан у дрозофилы. Изолированный рецептор вместе со своим белком-партнером USP готов связываться с EcR, а не с ДНК, и Hsp90 переводит гормон-связанный рецептор в активное ДНК-связывающее состояние [34].

Существует еще один механизм взаимодействия, позволяющий человеческому Hsp90 регулировать его собственную экспрессию, изолируя мономерную неактивную форму HSF1 (heat shock transcription factor) в нестрессовых условиях [35], когда беспорядочно уложенные белки, образовавшиеся в результате стрессового состояния, могут конкурировать с HSF1 за связывание с Hsp90, освобождая транскрипционный фактор для тримеризации и инициации стрессового ответа (heat shock response).

GR – превосходная модель для изучения ядерно-цитоплазматического передвижения фактора транскрипции из цитоплазмы в ядро, поскольку он обычно локализован в цитоплазме клеток, свободных от гормона, и его быстрое перемещение в ядро является гормон-зависимым. Установлено, что рецепторы GR постоянно курсируют между цитоплазмой и ядром и, таким образом, через его лиганд-зависимую трансформацию поддерживают ядерное накопление комплекса GR/Hsp90 [36]. Перемещение GR происходит совместно с Hsp90. Зависимая от лиганда трансформация конвертирует рецептор из состояния, образующего «устойчивый» комплекс с Hsp90, в состояние, когда комплекс GR/Hsp90 более активен в цикле ассимиляции и диссимиляции комплекса GR/Hsp90. Более активный комплекс необходим для быстрого движения рецептора.

Модель ретроградного передвижения GR с помощью динеина вдоль цитоскелетных треков впервые предложена в работе [37]. За истекшие годы эта модель была усовершенствована. Сейчас известно, что некоторое количество Hsp90-связанных иммунофилинов соединены пептидил-пролилизомеразными (PPIase) доменами с цитоплазматическим денином. Комплекс выделен из клеток и реконструирован в бесклеточной системе [38]. Передвижение GR и некоторых других факторов транскрипции из цитоплазмы в ядро замедлится или блокируется ингибиторами Hsp90, коэкспрессией фрагмента PPIase-домена, блокирующего связывание иммунофилина с денином, и коэкспрессией динамитина, вызывающего диссоциацию денина и его «ноши». Таким образом, имеются четкие доказа-

зательства *in vivo* для аргументации модели перемещения GR.

В отличие от проникновения белков в митохондрии и другие органеллы, где белки должны находиться в развернутом состоянии, в случае их прохождения через NPC белки остаются нативными благодаря значительному размеру поры для достаточно больших мультимерных комплексов – $(1-3)10^6$ Да [38]. Как только они приближаются к ядерной мембране, сигнальные белки попадают в поры благодаря облегченной диффузии. В настоящее время доминирует модель рецептор/Hsp90/иммунофилинового комплекса для прохождения через ядерные поры [39]. На самом деле ни Hsp90, ни Hsp90-связанные иммунофилины не имеют своих собственных сигналов ядерной локализации – NLSs (nuclear localization signal). Они присутствуют в ядре благодаря их сопутствующему переносу многочисленными NLS-содержащими «клиентными» белками.

Взаимодействие ядерных белков с растворимыми или находящимися в агрегатном состоянии партнерами явно ухудшает их подвижность [40]. Специфические ядерные компартменты часто управляют функциями ядерных белков. В частности, продемонстрировано [41] перемещение белков от ядра вдоль треков через поры, но природа нитей (кто выполняет роль ядерного актина?) и потенциальных двигательных моторных белков (роль ядерного миозина?) неизвестна. На примере клеток яичника китайского хомячка показано, что экспрессируемый ядерный GR FKBP52 расположен в тех же локусах ядра, что и свободный от гормона GR. Подобная локализация согласуется с представлением о том, что FKBP52 двигается к мишени, по крайней мере, по предложенному «установленному пространству» (staging areas) внутри ядра.

Существуют доказательства того, что комплекс GR/Hsp90 необходим для закрепления гормона: это подтверждается и способностью рецептора рециклировать в комплексе GR/Hsp90 внутри ядра. В лаборатории Дефранко продемонстрирован такой цикл в пределах ядра [42]. Установлено, что GR, освобожденный от хроматина, может повторно им использоваться при связывании гормона без выхода из ядра. Гельданамицин ингибирует повторное

использование гормона и, следовательно, ингибирует освобождение GR от хроматина. Это согласуется с ролью комплекса Hsp90/Hsp70 в терминации транскрипционной активности при снижении уровня свободного гормона. Также в системе *in situ* показано перемещение рецептора в пределах ядра на модели очищенного комплекса Hsp90/Hsp70. После диссоциации гормона (H) GRs освобождаются от участков связывания на хроматине. Однако не известно, в каком случае происходит превращение димера GR в мономер: пока рецептор привязан к хроматину или когда он собирается в комплекс с Hsp90? Стехиометрия финального гетерокомплекса – это одна молекула GR, связанная с димером Hsp90 [43]. Кошаперон Нор организует все шапероны, участвующие в этом процессе, в единый комплекс – Hsp90/Нор/Hsp70/Hsp40. Когда АТФ-связывающий центр комплекса GR/Hsp90 находится в активной конформации, GR возвращается в связывающее состояние, а p23 взаимодействует с Hsp90 для стабилизации комплекса. Ядерный GR, повторно использованный в комплексе GR-Hsp90-p23, может взаимодействовать с гормоном без выхода из ядра и снова участвовать в связывании.

Компонент p23 является важным инструментом в исследовании роли Hsp90 при диссоциации транскрипционного комплекса (transcription complex disassembly) и в изучении повторного связывания рецептора в ядре. В экспериментах *in vitro* продемонстрированы два механизма действия p23 [24]. В опытах по сборке GR/Hsp90 показано, что p23 работает как кошаперон Hsp90 и взаимодействует с комплексом GR/Hsp90 как только он сформировался, стабилизируя его. p23 может действовать и как шаперон, ингибируя агрегацию денатурированных белков, поддерживая их в свернутом состоянии. Исследованиями *in vivo* установлено участие p23 в стабилизации шаперонового комплекса Hsp90/Hsp70 [44]. Есть также много свидетельств того, что Hsp90 в составе гетерокомплекса вовлечен в передвижение транскрипционных факторов, являющихся «клиентными» белками Hsp90, по цитоплазме и ядру.

Hsp90 и деградация белков. Визитной карточкой деятельности ансамицина в живой клетке является индукция деградации шапероном Hsp90 суб-

стратных белков убиквитин-зависимым протеосомным путем. Хотя исторически ансамицины обнаружены как ингибиторы тирозиновых киназ, сейчас они известны как ингибиторы Hsp90. Ансамицины могут ингибировать шаперон-опосредованный фолдинг субстратов Hsp90, блокируя их диссоциацию от Hsp90. С другой стороны, некоторые субстратные белки высвобождаются аксамицином из комплекса с Hsp90 [45].

Каким образом Hsp90-связанные пептиды служат мишенью для деградации? TPR кошаперон CHIP, узнающий оба шаперона (Hsp90 и Hsc70), содержит так называемый U-домен, гомологичный E4-убиквитининовым факторам, и может презентовать шаперон-связанные неуложенные белки для убиквитинирования. Таким образом, суперэкспрессия CHIP в культивированных клетках приводит к увеличению убиквитинирования и деградации GR и трансмембранного регулятора муковисцидоза CFTR, являющихся субстратами Hsp90 и Hsc70. Активность CHIP очень важна для кинетики белкового фолдинга и деградации. Благодаря этой активности субстраты дольше взаимодействуют с Hsp90, например, в результате ингибирования АТФазного центра для их дальнейшего убиквитинирования. Существование CHIP наводит на мысль о том, что подобно белковому фолдингу деградация белков регулируется дополнительными факторами [46].

Недавно продемонстрировано [47], что Hsp90 связывается непосредственно с рибосомным белком S3 (rpS3). В результате образования комплекса Hsp90/rpS3 рибосомный белок rpS3 защищен от убиквитинирования и протеасомной деградации, что позволяет ему впоследствии сохранять свою функцию в биогенезе рибосомы. Ингибиторы Hsp90 влияют на диссоциацию rpS3 от Hsp90, дальнейшую ассоциацию белка с Hsp70 и индукцию его деградации. Также обнаружено, что и рибосомный белок S6 (rpS6) взаимодействует с Hsp90, а ингибиторы шаперона оказывают подобное действие на его диссоциацию от Hsp90 и дальнейшую деградацию. Таким образом, можно утверждать, что Hsp90 регулирует функцию рибосом за счет поддержания стабильности 40S рибосомных белков, таких, например, как rpS3 и rpS6.

Кардиопротекция и фармакологическое действие Hsp90. В экспериментах на культуре кардиомиоцитов установлено, что Hsp90 стабилизирует белок ErbB2 [48], являющийся важным компонентом в GPCR-сигнальном пути кардиомиоцитов. При исследовании влияния ингибитора раковых клеток доксорубин в опытах на крысах показано, что Hsp90 в свою очередь ответствен за стабилизацию ErbB2 в сердце [49]. Повышение количественного уровня ErbB2 в сердце в ответ на повреждение может явиться толчком к выживанию клеток. Но повреждения выше порогового уровня (высокие концентрации доксорубин) не могут быть предотвращены активацией ErbB2 или Akt. Важно, что увеличение концентрации ErbB2 (а также дальнейшая активация GPCR-сигналов) происходит до очевидных нарушений систолической функции сердца. Такое изменение содержания ErbB2 может быть использовано для диагностики пациентов, получающих лечение анти-ErbB2 при раке молочной железы и у которых появляется риск развития сердечных симптомов. Ингибитор доксорубин увеличивает диссоциацию ErbB2 и Hsp90, что приводит к деградации белка ErbB2. И, как следствие лечение рака молочной железы, наблюдается рост уровня экспрессии Hsp90 и Hsp70 в сердце. Оксидативные индуцированные стрессом повреждения миокарда влияют на экспрессию *in vivo* Hsp90. Помимо доксорубин циклоспорин А [50] также индуцирует *in vivo* экспрессию Hsp90 в сердце, что связано с модуляцией эндотелиального NO-синтазного сигнального пути. Очевидно, что при поиске новых антираковых лекарственных средств необходимо оценивать их возможные побочные эффекты *in vivo*, а именно – их влияние, в частности, на уровень Hsp90 в клетке в том числе и кардиомиоцитов.

Суперэкспрессия Hsp90 в ишемической области инфаркта миокарда может предохранять сердечную мышцу от ишемично-реперфузной дилатации за счет стимуляции эндотелиального пути NO [51]. На культуре эндотелиальных клеток показано, что кардиопротекторное действие Hsp90 ассоциировано с его способностью взаимодействовать как адаптор и с киназой Akt, и с кальциневрин-фосфатазой, промотируя фосфорилирование Ser₁₁₇₇ и дефосфо-

рилирование Thr₄₉₅ eNOS-синтазы (endothelial nitric oxide synthase) одновременно. Hsp90 является перспективной мишенью для увеличения образования eNOS *in vivo*, что может быть эффективным в плане снижения уровня миокардиального/реперфузного повреждения.

Роль Hsp90 в регуляции апоптоза неоднозначна и зависит от апоптических стимулов, а эффект действия Hsp90 обычно антиапоптотический. Образование комплекса Akt-Hsp90 *in vivo* стабилизирует деятельность киназы Akt и защищает клетки от апоптоза, предотвращая дефосфорилирование Akt [30]. Киназы Raf-1, MEK участвуют в таких важных клеточных процессах, как пролиферация, дифференциация, апоптоз, и являются важными участниками патогенеза кардиогипертрофии и сердечной недостаточности [52]. Hsp90 обнаружен в ассоциации со многими компонентами и регуляторами сигнального пути Raf-1/MEK [53]. Hsp90 причастен к активации киназы Raf-1. Мутации молекулы Hsp90 из *Drosophila* супрессируют активность Raf-1 и уменьшают сродство между Hsp90 и Raf-1. Гельданамицин также ингибирует формирование комплекса Raf-1/Hsp90 и приводит к деградации Raf-1. Активация деятельности киназы Raf-1 предотвращает апоптоз кардиомиоцитов [52]. Сам по себе Hsp90 или в комплексе с Hsp70 связывает Araf-1 и препятствует образованию комплекса Araf-1 с цитохромом C, являясь негативным регулятором CytC-опосредованного апоптоза. Исходя из вышеизложенного можно смело утверждать, что Hsp90 принимает активное участие в предотвращении апоптоза кардиомиоцита.

Процесс образования новых миофибрилл происходит на протяжении всего периода развития организма. Как известно, кардиомиоциты не делятся, но способны отвечать на возрастающую гемодинамическую нагрузку, увеличивая массу и мощность сократительного аппарата. Такая гипертрофия сердца может происходить как в норме (например, у спортсменов, испытывающих большие физические нагрузки), так и при заболеваниях сердца различной этиологии. В наиболее тяжелых формах разрастание ткани сердца приводит к сокращению размеров его камер, снижению объема

выбрасываемой крови и представляет угрозу для жизни пациента [54].

Известно, что Hsp90 и Hsc70 связываются миозином, формируя мультимерный комплекс нитей миозина. Период полужизни такого комплекса короткий. Он накапливается в случае ингибирования Hsp90 гельданамицином или в результате других причин, откладывающих сборку миофибриллы. Вероятно, при гипертрофии кардиомиоцит запускает тот же механизм, что и в эмбриональный период, когда происходит синтез миофибрилл, определяемый белками-регуляторами. Подавив в кардиомиоцитах биосинтез этих регуляторных компонентов, удалось остановить сборку миофибрилл.

Как отмечалось выше, активность Hsp90 (подобно другим шаперонам) регулируется и модулируется через взаимодействие с адапторными белками и кошаперонами, такими, например, как p23 или недавно открытые Sgt1 [55] и мелузин [56, 57]. Оказалось, что Sgt1 присутствует в различных клетках и тканях млекопитающих, включая скелетные и мышечные, а мелузин синтезируется только в скелетной и сердечной ткани. Взаимодействие Sgt1 и Hsp90/Hsp70 модулируется белком S100A6 Ca²⁺-зависимым способом, что может быть существенным моментом в развитии апоптоза, зависящего от внутриклеточной концентрации кальция.

Недавними исследованиями продемонстрировано, что мелузин является новым компонентом – кошапероном Hsp90, способным защитить цитратсинтазу (CS) от агрегации, возможной в результате теплового шока [58]. Интересен и тот факт, что ингибиторы Hsp90 являются индукторами синтеза шаперонов и, в частности, самого Hsp90 в клетке. Синтез шаперонов в клетке индуцируется HSF-1. Hsp90 диссоциирует от HSF-1 в момент его активации благодаря конкурентному связыванию беспорядочно уложенных белков [59]. Ингибиторы Hsp90 способствуют транскрипционной активности HSF-1 за счет разрушения комплекса Hsp/HSF-1, в результате чего HSF-1 высвобождается и транслируется в ядро, фосфорилируется и связывается с HSE, индуцируя транскрипцию генов *hsp40*, *hsp70* и *hsp90*. В частности, ингибитор радицикол активирует транскрипцию генов шаперонов в клет-

ках неонатальних кардиомиоцитів крыси із-за зв'язування Hsp90.

Таким образом, Hsp90 модулює рівень кардіопротекції кардиомиоцитів, безпосередньо управляє експресією Hsp90 через його здатність зв'язувати HSF 1 [60]. В кардиомиоцитах експресія Hsp90 і кардіопротекція модулюються кількістю Hsp90. А застосування нетоксичних производних радицикола може стати одним із етапів розвитку терапевтичних засобів для лікування серцево-судинних захворювань.

Введення гена *hsp90* в міокард [53] запобігає ішемічному кардіомиокардиту у свиней і стимулює синтез eNOS шапероном Hsp90. Хорошо відомо, що NO має кардіопротекторну функцію, але разом з тим зростання рівня його синтезу викликає утворення супероксидрадикалами цитотоксических піроксинитритів, пошкоджують тканину. Довготривале продукування NO, спричинене накопиченням супресора опухливого росту p53, призводить до апоптозу.

Незважаючи на те, що супероксиданион також індукуює апоптоз, баланс цих двох радикалів викликає перехресний захисний ефект і процес апоптозу значно затримується [61]. Дослідження функцій молекулярного шаперона Hsp90, однією з яких є кардіопротекція, а також оцінка можливої ролі інгібіторів Hsp90 в цій функції, робить вказаний білок перспективним інструментом в кардіоваскулярній терапії.

I. V. Kroupskaya

Hsp90 molecular chaperone: structure, functions and participation in cardio-vascular pathologies

Summary

The review is devoted to the analysis of structural and functional properties of molecular chaperone Hsp90. Hsp90 is a representative of highly widespread family of heat shock proteins. The protein is found in eubacteria and all branches of eukarya, but it is apparently absent in archaea. It is one of key regulators of numerous signalling pathways, cell growth and development, apoptosis, induction of autoimmunity, and progression of heart failure. The full functional activity of Hsp90 shows up in a complex with other molecular chaperones and co-chaperones. Molecular interactions between chaperones, different signalling proteins and protein-partners are highly crucial for the normal functioning of signalling pathways and their destruction causes an alteration in the cell physiology up to its death.

Keywords: Hsp90, domain, crystal structure, signalling pathways, apoptosis.

I. V. Kroupskaya

Молекулярний шаперон Hsp90: структура, функції та участь у кардіоваскулярній патології

Резюме

Огляд присвячено аналізу структурних і функціональних властивостей молекулярного шаперону Hsp90. Hsp90 є представником широко розповсюдженої родини білків теплового шоку. Його знайдено в бактеріях та в еукаріотах, але він відсутній в археобактеріях, є одним із ключових регуляторів багаточисельних сигнальних шляхів, які обумовлюють ріст і розвиток клітин, апоптоз, індукцію аутоімунних процесів і прогресію серцевої недостатності. Повна функціональна активність цього білка виявляється у комплексі з іншими молекулярними шаперонами та кошаперонами. Молекулярні взаємодії між шаперонами, різноманітними сигнальними білками і білками-партнерами критичні для нормального функціонування сигнальних шляхів, а їхнє порушення призводить до змін у фізіології клітини і навіть до її загибелі.

Ключові слова: Hsp90, домен, кристалічна структура, сигнальний шлях, апоптоз.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Seckler R., Jaenicke R. Protein folding and protein refolding // *The FASEB J.*—1992.—**6**.—P. 2545–2552.
2. Ellis J. Proteins as molecular chaperones // *Nature.*—1987.—**328**, N 6129.—P. 378–379.
3. Versteeg S., Mogk A., Schumann W. The *Bacillus subtilis* *hspG* gene is not involved in thermal stress management // *Mol. Gen. Genet.*—1999.—**261**, N 4.—P. 582–588.
4. Prodromou C., Piper P. W., Pearl L. H. Expression and crystallisation of the yeast Hsp82 chaperone and preliminary X-ray diffraction studies of the amino-terminal domain // *Proteins: Structure, Function, Genetics.*—1996.—**25**, N 4.—P. 517–522.
5. Pearl L. H., Prodromou C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery // *Annu. Rev. Biochem.*—2006.—**75**.—P. 271–294.
6. Obermann W. M. J., Sondermann H., Russo A. A., Pavletich N. P., Hartl F. U. *In vivo* function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis // *J. Cell Biol.*—1998.—**143**, N 4.—P. 901–910.
7. Prodromou C., Roe S. M., Piper P. W., Pearl L. H. A molecular clamp in the crystal structure of the N-terminal domain of the yeast Hsp90 chaperone // *Nat. Struct. Biol.*—1997.—**4**, N 2.—P. 477–482.
8. Chavany C., Mimnaugh E., Miller P., Bitton R., Nguyen P. p185erbB2 binds to GRP94 *in vivo* // *J. Biol. Chem.*—1996.—**271**, N 9.—P. 4974–4977.
9. Prodromou C., Roe S. M., O'Brien R., Ladbury J. E., Piper P. W., Pearl L. H. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone // *Cell.*—1997.—**90**, N 1.—P. 65–75.
10. Soldano K. L., Jivan A., Nicchitta C. V., Gewirth D. T. Structure of the N-terminal domain of GRP94 // *J. Biol. Chem.*—2003.—**278**, N 48.—P. 48330–48338.
11. Huai Q., Wang H. C., Liu Y. D., Kim H. Y., Toft D., Ke H. M. Structures of the N-terminal and middle domains of *E. coli*

- Hsp90 and conformation changes upon ADP binding // *Structure*.—2005.—**13**, N 6.—P. 579–590.
12. Meyer P., Prodromou C., Hu B., Vaughan C., Roe S. M., Panaretou B., Piper P. W., Pearl L. H. Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions // *Mol. Cell*.—2003.—**11**, N 3.—P. 647–658.
 13. Minami Y., Kimura Y., Kawasaki H., Suzuki K., Yahara I. The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function *in vivo* // *Mol. Cell. Biol.*—1994.—**14**, N 2.—P. 1459–1464.
 14. Harris S. F., Shiao A. K., Agard D. A. The crystal structure of the carboxy-terminal dimerization domain of htpG, the *Escherichia coli* Hsp90, reveals a potential substrate binding site // *Structure*.—2004.—**12**, N 6.—P. 1087–1097.
 15. Prodromou C., Panaretou B., Chohan S., Siligardi G., O'Brien R., Ladbury J. E., Roe S. M., Piper P. W., Pearl L. H. The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular «clamp» via transient dimerization of the N-terminal domains // *The EMBO J.*—2000.—**19**, N 16.—P. 4383–4392.
 16. Louvion J. F., Warth R., Picard D. Two eukaryote-specific regions of Hsp82 are dispensable for its viability and signal transduction functions in yeast // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1996.—**93**, N 24.—P. 13937–13942.
 17. Siligardi G., Hu B., Panaretou B., Piper P. W., Pearl L. H., Prodromou C. Co-chaperone regulation of conformational switching in the Hsp90 ATPase cycle // *J. Biol. Chem.*—2004.—**279**, N 50.—P. 51989–51998.
 18. McLaughlin S. H., Ventouras L. A., Lobbezoo B., Jackson S. E. Independent ATPase activity of Hsp90 subunits creates a flexible assembly platform // *J. Mol. Biol.*—2004.—**344**, N 3.—P. 813–826.
 19. Berger J. M., Gamblin S. J., Harrison S. C., Wang J. C. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II // *Nature*.—1996.—**379**, N 6562.—P. 225–232.
 20. Ban C., Junop M., Yang W. Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis: a switch in DNA mismatch repair // *Cell*.—1999.—**97**, N 1.—P. 85–97.
 21. Young J. C., Hartl F. U. Polypeptide release by Hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23 // *The EMBO J.*—2000.—**19**, N 17.—P. 5930–5940.
 22. Soti C., Racz A., Csermely P. A nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-terminal domain of hsp90: N-terminal nucleotide binding unmasks a C-terminal binding pocket // *J. Biol. Chem.*—2002.—**277**, N 9.—P. 7066–7075.
 23. Pratt W. B., Galigniana M. D., Harrell J. M., DeFranco D. B. Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signaling protein movement // *Cell. Signal.*—2004.—**16**, N 8.—P. 857–872.
 24. Perez-Terzic C., Gacy M. A., Bortolon R. Directed inhibition of nuclear import in cellular hypertrophy // *J. Biol. Chem.*—2001.—**276**, N 23.—P. 20566–20571.
 25. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling // *Physiol. Rev.*—1999.—**79**, N 1.—P. 215–262.
 26. Schlatter H., Langer T., Rosmus S., Onneken M.-L., Fasold H. A novel function for the 90 kDa heat-shock protein (Hsp90): facilitating nuclear export of 60S ribosomal subunits // *Biochem. J.*—2002.—**362**, N 3.—P. 675–684.
 27. Vittone M. B. A., Maraldi N. M. Cell stress and ribosome crystallization // *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*—1995.—**27**, N 2.—P. 199–207.
 28. Helmbrecht K., Zeise E., Rensing L. Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review // *Cell Prolif.*—2000.—**33**, N 6.—P. 341–365.
 29. Sato S., Fujita N., Tsuruo T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90 // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2000.—**97**, N 20.—P. 10832–10837.
 30. Young J. C., Moarefi I., Hartl F. U. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool // *J. Cell Biol.*—2001.—**154**, N 2.—P. 267–274.
 31. Imai J., Yahara I. Role of Hsp90 in salt stress tolerance via stabilization and regulation of calcineurin // *Mol. Cell. Biol.*—2000.—**20**, N 24.—P. 9262–9270.
 32. Dittmar K. D., Banach M., Galigniana M. D., Pratt W. B. The role of DnaJ-like proteins in glucocorticoid receptor-hsp90 heterocomplex assembly by the reconstituted hsp90-p60-hsp70 foldosome complex // *J. Biol. Chem.*—1998.—**273**, N 13.—P. 7358–7366.
 33. Pratt W. B., Toft D. O. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery // *Exp. Biol. and Med.*—2003.—**228**.—P. 111–133.
 34. Arbeitman M. N., Hogness D. S. Molecular chaperones activate the *Drosophila* ecdysone receptor, an RXR heterodimer // *Cell*.—2000.—**101**, N 1.—P. 67–77.
 35. Zou J., Guo Y., Guettouche T., Smith D., Voellmy R. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1 // *Cell*.—1998.—**94**, N 4.—P. 471–480.
 36. DeFranco D. B., Madan A. P., Tang Y., Chandran U. R., Xiao N., Yang J. Nucleocytoplasmic shuttling of steroid receptors // *Vitam. Horm.*—1995.—**51**.—P. 315–338.
 37. Davies T. H., Ning Y. M., Sanchez E. R. A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins // *J. Biol. Chem.*—2002.—**277**, N 7.—P. 4597–4600.
 38. Gorlich D., Kutay U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm // *Annu. Rev. Cell Biol.*—1999.—**15**.—P. 607–660.
 39. Hache R. J. G., Tse R., Reich T., Savory G. A., Lefebvre Y. A. Nucleocytoplasmic trafficking of steroid-free glucocorticoid receptor // *J. Biol. Chem.*—1999.—**274**, N 3.—P. 1432–1439.
 40. Phair R. D., Misteli T. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus // *Nature*.—2000.—**404**, N 3.—P. 604–609.
 41. Meier U. T., Blobel G. Nopp140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm // *Cell*.—1992.—**70**, N 1.—P. 127–138.
 42. Czar M. J., Owens-Grillo J. K., Yem A. W. The hsp56 immunophilin component of untransformed steroid receptor complexes is localized both to microtubules in the cytoplasm and to the same nonrandom regions within the nucleus as the steroid receptor // *Mol. Endocrinol.*—1994.—**8**, N 12.—P. 1731–1741.
 43. DeFranco D. B. Navigating steroid hormone receptors through the nuclear compartment // *Mol. Endocrinol.*—2002.—**16**, N 7.—P. 1449–1455.
 44. Morishima Y., Kanelakis K. C., Murphy P. J. M., Lowe E. R., Jenkins G. J., Osawa Y., Sunahara R. K., Pratt W. B. The Hsp90 cochaperone p23 is the limiting component of the multiprotein Hsp90/Hsp70-based chaperone system *in vivo* where it acts to stabilize the client protein/Hsp90 complex // *J. Biol. Chem.*—2003.—**278**, N 49.—P. 48754–48763.
 45. Meacham G. C., Patterson C., Zhang W., Younger J. M., Cyr D. M. The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation // *Cell Biol.*—2001.—**3**.—P. 100–105.

46. Hohfeld J., Cyr D. M., Patterson C. From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation // *EMBO Rep.*—2001.—2, N 10.—P. 885–890.
47. Kim T-S., Jang C-Y., Kim H. D., Lee J. Y., Ahn B-Y., Kim J. Interaction of Hsp90 with ribosomal proteins protects from ubiquitination and proteasome-dependent degradation // *Mol. Biol. Cell.*—2006.—17, N 2.—P. 824–833.
48. Zaarur N., Gabai V. L., Porco J. A., Calderwood S., Sherman M. Y. Targeting heat shock response to sensitize cancer cells to proteasome and Hsp90 inhibitors // *Cancer Res.*—2006.—66, N 31.—P. 783–791.
49. Gabrielson K., Bedja D., Pin S., Tsao A., Gama L., Yuan B., Muratore N. Heat shock protein 90 and ErbB2 in the cardiac response to doxorubicin injury // *Cancer Res.*—2007.—67, N 4.—P. 1436–1441.
50. Rezzani R., Rodella L., Dessy C., Daneau G., Bianchi R., Feron O. Changes in HSP90 expression determine the effects of cyclosporine A on the NO pathway in rat myocardium // *FEBS Lett.*—2003.—552, N 2–3.—P. 125–129.
51. Kupatt C., Dessy C., Hinkel R., Raake P., Daneau G., Bouzin C., Boekstegers P., Feron O. Heat shock protein 90 transfection reduces ischemia-reperfusion-induced myocardial dysfunction via reciprocal endothelial NO synthase Serine 1177 phosphorylation and Threonine 495 dephosphorylation // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*—2004.—24, N 8.—P. 1435–1441.
52. Yamaguchi O., Watanabe T., Nishida K., Kashiwase K., Higuchi Y., Takeda T., Hikoso S., Hirotsu S., Asahi M., Otsu K. Cardiac-specific disruption of the *c-raf-1* gene induces cardiac dysfunction and apoptosis // *J. Clin. Invest.*—2004.—114, N 7.—P. 937–943.
53. Nollen E. A. A., Morimoto R. I. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing «heat shock» proteins // *J. Cell Sci.*—2002.—115, N 14.—P. 2809–2816.
54. Srikakulam R., Winkelmann D. A. Chaperone-mediated folding and assembly of myosin in striated muscle // *J. Cell Sci.*—2004.—117, N 4.—P. 641–652.
55. Nowotny M., Spiechowicz M., Jastrzebska B., Filipek A., Kitagawa K., Kuznicki J. Calcium-regulated interaction of Sgt1 with S100A6 (Calcyclin) and other S100 proteins // *J. Biol. Chem.*—2003.—278, N 29.—P. 26923–26928
56. Brancaccio M., Guazzone S., Menini N., Sibona E., Hirsch E., De Andrea M., Rocchi M., Altruda F., Tarone G., Silengo L. Melusin is a new muscle specific interactor for beta(1) integrin cytoplasmic domain // *J. Biol. Chem.*—1999.—274, N 41.—P. 29282–29288.
57. Michowski W., Lee Y-T., Chazin W. J., Kuznicki J. Melusin binds calyculin (S100A6) protein in a Ca²⁺-dependent fashion // *Eur. J. Biochem.*—2003.—1 Suppl., 1 July: Abstr. N P3.7–09.
58. Sbroggib M., Ferretti R., Percivalle E., Gutkowska M., Zyllicz A., Michowski W., Kuznicki J., Accornero F., Pacchioni B., Lanfranchi G., Hamm J., Turco E., Silengo L., Tarone G., Brancaccio M. The mammalian CHORD-containing protein melusin is a stress response protein interacting with Hsp90 and Sgt1 // *FEBS Lett.*—2008.—582, N 13.—P. 1788–1794.
59. Morimoto R. I. Dynamic remodeling of transcription complexes by molecular chaperones // *Cell.*—2002.—110, N 3.—P. 281–284.
60. Griffin T. M., Valdez T. V., Mestrlil R. Radicol activates heat shock protein expression and cardioprotection in neonatal rat cardiomyocytes // *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*—2004.—287, N 3.—P. 1081–1088.
61. Ferdinandy P., Schulz R. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning // *Brit. J. Pharmacol.*—2003.—138, N 4.—P. 532–543.

УДК 577.21

Надійшла до редакції 27.11.08

Рисунки до статті І. В. Крупської та співавт.

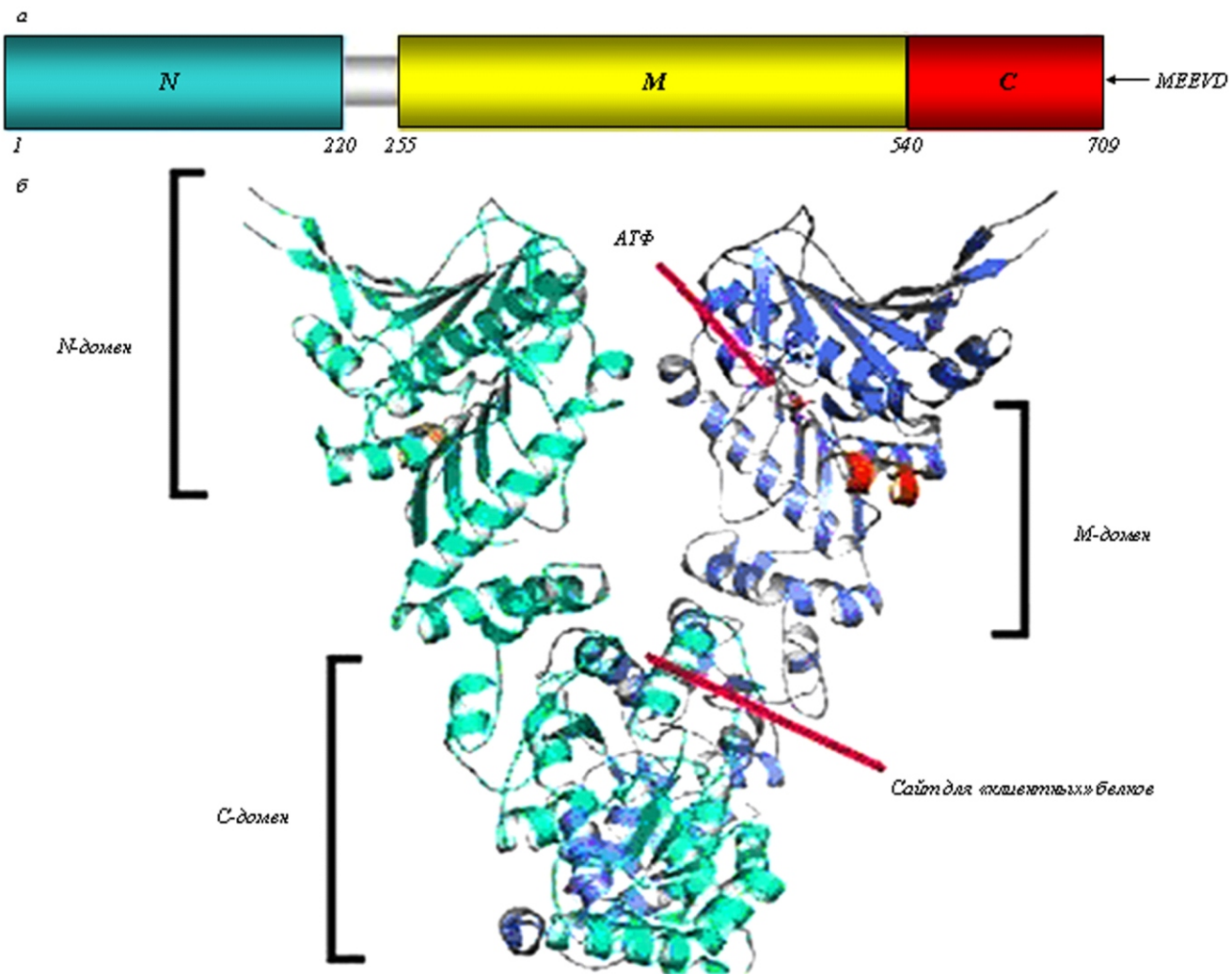


Рис. 1. Доменная организация (а) и структура (б) дрожжевого молекулярного шаперона Hsp90 [5]

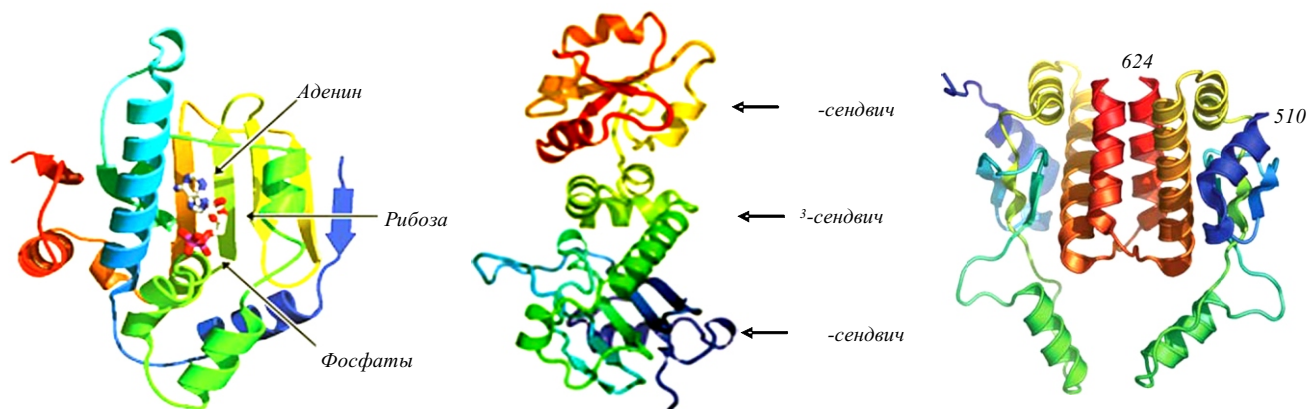


Рис. 2. Кристаллическая структура Hsp90 (модифицировано из [5]): а – структура N-домена дрожжевого Hsp90 (показан сайт связывания с АТФ); б – структура M-домена дрожжевого Hsp90; в – структура C-домена HtpG *E. coli*, гомолога Hsp90