

Бактериальные шаперонины

В. Н. Ерко

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
Ул. Васильковская, 31/17, Киев, 03022, Украина
E. mail: molgen@plant.ifrg.freenet.kiev.ua;

Обзор посвящен последним достижениям в понимании основных механизмов посттрансляционной сборки белков у бактерий. Особое внимание уделено роли шаперонинов, их структуре и механизму работы при облегчении сборки белков. Обсуждается также специфичность шаперонинов в связи с существованием множественных генов их синтеза в некоторых бактериях.

Белкам присуще почти бесконечное количество разнообразных свойств, зависящих от перестановки аминокислот в их цепях. Белки выступают как катализаторы в химических реакциях, ускоряя их в миллионы раз, различают молекулы на основе самых малых изменений в их химической структуре и форме, формируют структуры с высоким уровнем организации, такие как мускульные волокна и вирусные частички, и могут выполнять свои функции по организации жизни в широком температурном диапазоне.

Чтобы проявить свои свойства независимо от того, какую функцию выполняет белок — каталитическую, структурную, регуляторную или иную, он должен приобрести присущую ему третичную структуру. Вопрос, каким образом белки собираются до своей биологически активной конформации на протяжении длительного времени является одним из наиболее сложных в биологии.

Исследования, проведенные Анфинсеном с ферментом рибонуклеазой [1], показали, что фолдинг этого белка происходит спонтанно после денатурации *in vitro*. Этот феномен наблюдается для многих белков [2, 3], что привело к выявлению принципа самосборки, заключающегося в том, что вся информация, необходимая для фолдинга, полностью закодирована в линейной последовательности аминокислот, образующих полипептидную цепь.

Исследование сборки белков *in vitro* показало, что оптимальные условия для сборки индивидуаль-

ных белков различны, поэтому цитоплазма клетки должна представлять собой не самую лучшую среду для фолдинга. Более того, в связи с тем, что сотни белков синтезируются в тесном пространстве, в одно и то же время, а их фолдинг зависит от взаимодействия между аминокислотами, то полипептиды должны взаимодействовать друг с другом, образуя тяжело диссоциирующие агрегаты.

Поэтому было постулировано, что в клетке существуют кофакторы, участвующие в посттрансляционной сборке белков и предотвращающие их агрегацию.

В настоящее время установлено, что фолдинг новосинтезованных полипептидных цепей зависит от белков двух типов: катализаторов фолдинга и молекулярных шаперонов. Первые ускоряют формирование и разрыв ковалентных связей, образующихся между аминокислотами полипептида. Например, фермент дисульфидизомераза увеличивает скорость формирования, разрыва и обмена тиол-дисульфидных связей, образующихся между атомами серы остатков цистеина, сшивая ковалентными дисульфидными связями полипептидные цепи [4].

Принципиально иной механизм фолдинга обнаружен у молекулярных шаперонов. Они могут быть определены как белки, связывающиеся с нестабильными, ненативными формами протеинов, главным образом с их гидрофобными поверхностями, разрывают электростатические связи, возникшие между цепями белков, и при высвобождении полипептидной цепи направляют сборку протеина на продуктивный путь. Они также облегчают сборку как новосинтезированных белков, так и утра-

тивших свою нативную структуру при работе или воздействии каких-либо факторов.

Шапероны были известны задолго до открытия их функции по облегчению сборки белков благодаря свойству синтезироваться в больших количествах при температурном шоке. Современное объяснение феномена усиленного синтеза белков температурного шока при повышении температуры было дано в 1986 г. Пелхемом, который показал, что повышение температуры приводит к нестабильности структуры некоторых белков и предположил, что восстановление структуры этих белков достигается с помощью белков температурного шока [5].

Первое не прямое доказательство существования шаперонов было получено на мутантах *Escherichia coli*, в которых белки агрегировали значительно сильнее, чем в родительском штамме [6]. Это позволило предположить, что такие мутанты имеют дефекты в посттрансляционном фолдинге белков. Они оказались чрезвычайно температурочувствительными и неспособными к росту при температурах выше 20 °C [7]. Эти два свойства — тенденцию к образованию белковых агрегатов и температурочувствительность — удалось частично преодолеть, повысив клеточный уровень двух белков GroEL и GroES. Полная комплементация нормальных свойств клеток достигалась в случае, когда к сверхэкспрессии GroEL и GroES прибавлялась сверхэкспрессия двух других белков — DnaK и DnaJ.

Первым прямым доказательством реальной работы шаперонов в клетке была демонстрация Голубиновым с соавт. [8, 9] феномена улучшенной экспрессии растительного белка Рубиско в бактерии *E. coli* при повышенной экспрессии бактериальных белков GroEL и GroES одновременно. Важность этого открытия стала в особенности понятной, когда в лаборатории Эллиса было показано, что белок очень схожий с бактериальным GroEL существует в хлоропластах растений и необходим для экспрессии белка Рубиско непосредственно в растениях [10]. Эти исследователи предположили, что белки такого типа могут быть важнейшими для фолдинга многих протеинов и назвали их молекулярными шаперонами, хотя впервые термин «молекулярный шаперон» был использован в 1978 г. для нуклеоплазмينا, ответственного за сборку нуклеосом [11].

Окончательно роль шаперонов *in vivo* в сборке клеточных белков удалось доказать температурной инактивацией температурочувствительной формы GroEL. При этом количество ненативных белков в клетке быстро возрастало [12].

Поскольку шапероны участвуют в предотвра-

щении агрегации белков, то их синтез индуцируется не только температурным стрессом, но и иными стимулами, такими как вирусная инфекция, этанол, пуромицин, налидиксовая кислота, тяжелые металлы, осмотический и кислородный стрессы, лимитирование глюкозы, а также повышением уровня ненативных белков в клетке [13, 14].

Молекулярные шапероны объединены на основе схожести их аминокислотных последовательностей в несколько классов, включающих Hsp100 (ClpB, ClpA, ClpX), Hsp90 (HtpG), Hsp70 (DnaK), Hsp60 (GroEL) и α -кристаллин-подобные белки теплового шока (IbpA, IbpB) (обозначения соответствующих шаперонов *E. coli* показаны в скобках). Из этих классов только два (Hsp70 и Hsp60) используют энергию АТФ для индукции таких изменений в структуре белков, которые в дальнейшем приводят к приобретению белками их корректной, биологически активной структуры.

За последние 10 лет наиболее впечатляющие успехи были достигнуты при изучении Hsp60 класса молекулярных шаперонов, получивших название шаперонины. Это семейство привлекло к себе особое внимание в связи с их широкой распространенностью, сложностью структуры и удивительным механизмом действия. Они собирают белки, предоставляя им изолированное пространство внутри кольцевых комплексов, «выстеленных» гидрофобными остатками аминокислот, и используя энергию АТФ для изменения этого пространства и высвобождения белков из центрального отверстия.

Шаперонины обнаружены у всех эубактерий [15] и эукариотов, в органеллах прокариотического происхождения (митохондриях и хлоропластах) [16, 17]. Шаперонин цитоплазмы эукариотов (ССТ) и шаперонины археобактерий [18, 19], строение которых отличается от их бактериальных аналогов, в данном обзоре не рассматриваются.

В *E. coli* шаперонины синтезируются с бицистронного оперона, состоящего из groES и groEL генов, которые кодируют белки с молекулярной массой 10 и 60 кДа соответственно [20]. Инактивация любого из этих генов летальна [21–23].

Эксперименты, проведенные с ферментом Рубиско *in vitro*, показали, что денатурация рибулозобисфосфаткарбоксилазы является необратимой. Однако добавление к раствору Рубиско очищенных GroEL и GroES, а также источника энергии АТФ приводило к почти полной реконструкции активной формы белка [8, 9]. Таким образом, взаимодействие шаперонина с белком было смоделировано *in vitro*, что позволило перейти к детальному анализу механизма действия шаперонинов.

Электронно-микроскопические исследования

выявили, что шаперонин *E. coli* является симметричным комплексом [24, 25], состоящим из 14 одинаковых GroEL субъединиц [26]. Более поздние исследования кристаллической структуры шаперонина показали, что субъединицы GroEL олигомера собраны по семь в два кольца, которые прикреплены один к другому своими плоскими сторонами (рис. 1, GroEL; рис. 2) [27—29]. В середине этой структуры находится отверстие, названное по имени родоначальника теории самосборки белков, отверстием Анфинсена.

Рентгеноструктурный анализ GroEL мономера выявил интересные структурные особенности шаперонина. Каждый его GroEL мономер в составе тетрадекамера состоит из 547 аминокислотных остатков, собранных в три домена (рис. 2). Экваториальный домен (рис. 2, 3), который составляют остатки 6—133 и 409—523, высокоорганизован и состоит из α -спиралей [30]. В своем составе он несет сайт связывания с АТФ. N-концевые (1—5) и C-концевые (524—547) остатки аминокислот не находятся на поверхности шаперонина и, возможно, формируют часть центрального отверстия. Экваториальный домен обеспечивает все взаимодействия между двумя кольцами шаперонина и большинство взаимодействий между субъединицами отдельных колец шаперонина. Он соединен через маленький интермедиаальный домен (рис. 2, 2), состоящий из остатков 134—190 и 377—408, с апикальным доменом (рис. 2, 1), сформированным из остатков 191—376. Интермедиаальный домен выступает в качестве шарнира, соединяющего экваториальный домен с апикальным, и позволяет аллостерические перемещения апикального домена. Части последнего формируют отверстие Анфинсена и очень подвижны, давая возможность значительно увеличивать размер центрального отверстия при работе шаперонина (рис. 1, GroEL-АТФ, GroEL-GroES-АТФ; рис. 2). Мутации в этом подвижном

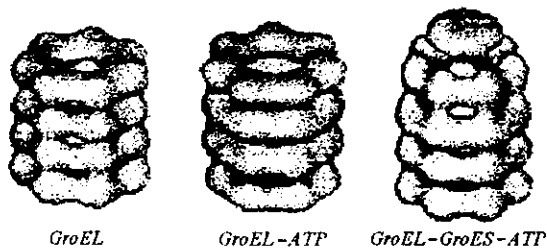


Рис. 1. Трехмерная реконструкция GroEL комплексов. По [37]

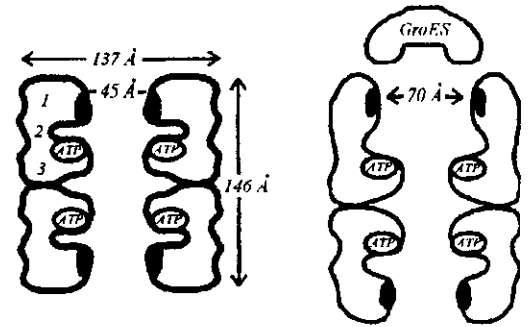


Рис. 2. Конформационные изменения шаперонина при взаимодействии с GroES (черными пятнами показаны сайты связывания с белком-субстратом): 1 — апикальный домен; 2 — интермедиаальный и 3 — экваториальный домены

доме не влияют на связывание шаперонина с белками-субстратами, а также на связывание шаперонина с GroES субъединицами [31]. Этот домен содержит множество гидрофобных остатков аминокислот и в кристаллической структуре шаперонина является наименее четко определяемым доменом, предположительно из-за его подвижности [30]. Работы по мутагенезу GroEL белка показали, что связывание белка-субстрата с шаперониновым комплексом происходит в отверстии Анфинсена [32, 33], которое способно вмещать протеины, имеющие молекулярную массу 60 и менее кДа [34]. Связывание субстрата также вызывает конформационные изменения в шаперонине GroEL [35].

Вопрос, может ли шаперонин обрабатывать одновременно несколько субъединиц одного белка, в случае, если размер белка позволяет ему быть помещенным в центральную полость шаперонина, остается открытым. Также неизвестно, как производится шаперонин-зависимый фолдинг многосубъединичных белков, молекулярная масса субъединиц которых превышает 60 кДа.

Составной частью полного шаперонинового комплекса является олигомер GroES белка, состоящий из семи субъединиц, образующих куполообразную структуру, напоминающую шапочку над одним из отверстий Анфинсена (рис. 1, GroEL-GroES-АТФ и рис. 2) [36]. GroES комплекс временно связывается с GroEL тетрадекамером при работе шаперонина и в физиологических условиях закрывает только один из выходов центрального отверстия [37]. Присоединение GroES к GroEL происходит только при наличии Mg-ADP или Mg-АТФ через подвижную петлю GroES, образованную аминокислотными остатками 17—32 [38]. При работе к каждому GroEL полипептиду присоединяет-

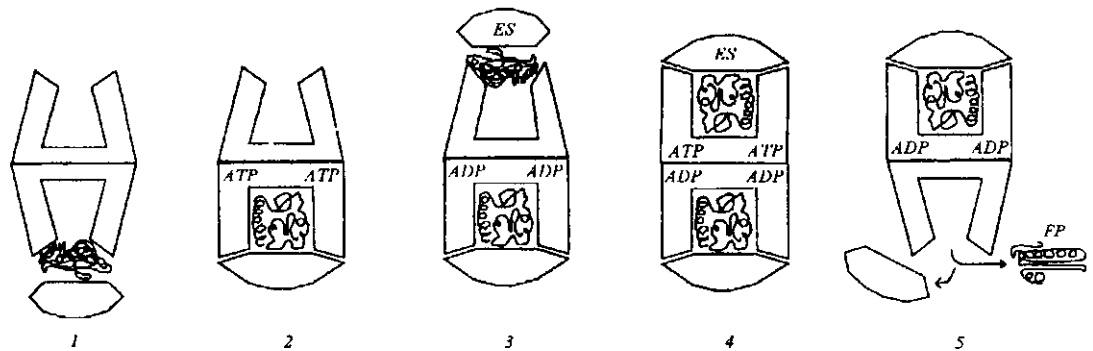


Рис. 3. Схема функционального цикла новосинтезированного шаперонина при сборке белков: 1—5 — стадии работы шаперонинового комплекса (подробности в тексте)

ся одна молекула АТФ, а к шаперониновому комплексу из 14 GroEL субъединиц — семь молекул АТФ.

Детальное изучение шаперонинового комплекса GroEL-GroES позволило создать модель его работы (рис. 3) [39—42]. При отсутствии связанных нуклеотидов апикальные домены GroEL субъединиц проявляют гидрофобные сайты связывания, обладающие высокой аффинностью к выступающим наружу гидрофобным участкам некорректно собранных белков, что приводит к присоединению субстрата к шаперонину (рис. 3, 1). Связывание GroES с апикальными доменами и белком-субстратом заставляет субстрат сместиться внутрь шаперонина. При смещении происходит диссоциация неправильно свернутых цепей полипептида (рис. 3, 2), поскольку одна часть полипептида остается связанной с апикальными доменами, а вторая — принудительно смещается в центральную полость шаперонина. Одновременно с процессом смещения белка внутрь к экваториальным доменам присоединяется АТФ. Это приводит к тому, что сайты связывания с белком становятся криптическими (рис. 3, 2). Гидролиз АТФ активирует противоположное GroEL кольцо, к которому присоединяются белок и GroES (рис. 3, 3). После присоединения АТФ к этому кольцу белок смещается внутрь кольца и происходит диссоциация его цепей (рис. 3, 4). Гидролиз АТФ на верхнем кольце приводит к таким конформационным изменениям в экваториальных доменах нижнего кольца шаперонина, которые вызывают отсоединение ADP от нижнего кольца и, как следствие этого, появление сайтов связывания с гидрофобными аминокислотами на внутренней поверхности его апикальных доменов. Результатом этого является отсоединение GroES и высвобождение белка из центральной полости (рис.

3, 5). Далее цикл начинается сначала, со стадии (3). Таким образом, гидролиз АТФ «руководит» циклом работы шаперонина [43].

Необходимо отметить, что модель работы шаперонина является умозрительной и во многих деталях не была подтверждена экспериментально.

Приобретение нативной структуры белком-субстратом не гарантируется в одном цикле АТФ гидролиза, и для тех случаев, когда это было подсчитано количественно, составляет 100—300 молекул АТФ на собранную субъединицу белка [44]. Это составляет около 10—20 % энергетической стоимости ковалентного синтеза белков [45].

В зависимости от белка-субстрата и условий эксперимента выход нативной структуры может быть как большим, так и незначительным, а время удерживания белка в шаперониновом комплексе может увеличиваться или уменьшаться. В среднем оно составляет около 15 с.

Некоторым белкам для сборки достаточно лишь взаимодействия с GroEL тетрадекамером или с GroES ко-шаперонином [46], в то время как другие белки требуют GroEL, GroES и АТФ [47]. Вопрос, какие структурные особенности белков определяют полную или частичную зависимость от шаперонина или от частей шаперонинового комплекса, остается открытым.

Эксперименты *in vitro* показали, что около 50 % всех белков *E. coli* могут связываться с шаперонинами [48]. Однако теоретические расчеты, базирующиеся на количестве GroEL в клетке и интенсивности синтеза белков, указывают на то, что, возможно, не больше 2—7 % полипептидов клетки действительно подпадают под шаперонинзависимый фолдинг [49, 50]. Данные по исследованию важности шаперонинов для жизнедеятельности *E. coli* показывают, что лишь 15 % новосинте-

зированных белков временно связываются с GroEL, прежде чем достигают собранного состояния [51]. Новые подходы к идентификации шаперонин-зависимых субстратов позволили выявить набор из 250—300 белков *E. coli*, нуждающихся в помощи шаперонинов при фолдинге. Среди этих субстратов обнаружены и компоненты процессов транскрипции и трансляции клетки, что объясняет летальность мутаций в шаперониновом комплексе [52].

Эксперименты с большим количеством негомологичных для шаперонинов белков-субстратов обнаружили, что шаперонины связываются с большинством проверенных ненативных белков. Причем связывание с некоторыми белками является необратимым, что, возможно, свидетельствует о еще не открытой функции шаперонинов в клетке как элемента, защищающего ее от чужеродных белков, например, при вирусной инфекции, или играющего определенную роль в селекции белков при их эволюции.

Еще одной малоисследованной чертой шаперонинов является их специфичность. Несмотря на большую консервативность GroEL и GroES белков, было выявлено, что шаперонины из разных организмов имеют различную аффинность к белкам-субстратам и различную эффективность сборки этих субстратов до нативного состояния [53, 54]. Более того, некоторые микроорганизмы имеют несколько копий генов синтеза шаперонинов [55—57], экспрессирующихся в зависимости от условий роста клеток, например, при переходе клетки к анаэробному или симбиотическому образу жизни [58—61].

В частности, клубеньковые бактерии *Rhizobium meliloti*, *R. leguminosarum* и *Bradyrhizobium japonicum* имеют 2—4 дополнительных оперона для синтеза шаперонинов. Мутации в этих оперонах приводят к различным нарушениям в развитии азотфиксирующего симбиоза с растениями. Предполагается, что это вызвано специфичностью шаперонинов при сборке белков азотфиксирующего аппарата бактерий [60, 61]. Какие последовательности в составе шаперонинового комплекса отвечают за специфичность, неизвестно.

Интересный пример возникновения шаперонинов с измененными свойствами представляет собой бактериофаг T4, несущий в составе своей ДНК ген синтеза GroES. GroEL-GroES шаперонин *E. coli* не способен собирать gp23 белок капсида этого бактериофага. Поэтому при фаговой инфекции бактериофаг T4 синтезирует субъединицы GroES шаперонинового комплекса, взаимодействующие с GroEL комплексом бактерии, заменяя бактериальные субъединицы GroES на фаговые. Такая замена

меняет свойства шаперонина и приводит к эффективной сборке капсида фага и развитию фаговой инфекции [62].

Обнаружение специфичности шаперонинов открывает новые возможности в их применении в биотехнологии для повышения выхода активной формы белков как бактериального, так и эукариотического происхождения. Недавно проведенные теоретические расчеты показали, что эффективность работы шаперонина может быть повышена [63].

Синтез гомологичных шаперонинов иногда связывают с патогенными свойствами микроорганизмов [64—68]. Исходя из роли шаперонинов в фолдинге белков маловероятно, что они могут выступать непосредственными факторами патогенности. Однако шаперонины способны опосредованно влиять на патогенность микроорганизмов, участвуя в сборке белков, определяющих их патогенность. В некоторых случаях шаперонин бактерии является основным антигенным компонентом микроорганизма, вызывающим иммунный ответ на инфекцию у человека [69, 70]. Возможно, это связано с их транспортом за пределы клетки патогена для обеспечения эффективной колонизации инфицированного организма [71].

Таким образом, несмотря на впечатляющие успехи, достигнутые за последние годы в изучении молекулярных шаперонов, а именно: в изучении структуры шаперонинов и шаперонинзависимой сборки белков, многие аспекты функционирования шаперонинов еще не получили должного научного освещения.

V. N. Erko

Chaperonins

Summary

This review is devoted to the progress made during the last decade towards understanding of basic mechanisms of post-translational protein folding in bacteria. Particular investigation was done on the role of chaperonins, their structure and mechanism of action in facilitating protein folding. The specificity of chaperonins in respect to the existence of multiple genes for chaperonins in some bacteria is discussed.

В. М. Єрко

Бактеріальні шапероніни

Резюме

Огляд присвячено останнім досягненням у розумінні основних механізмів посттрансляційного складання білків у бактерій. Основну увагу приділено ролі шаперонінів, їхній структурі і механізмові роботи при полегшенні складання білків. Обговорюється також специфічність шаперонінів у зв'язку з існуванням багаточисельних генів їхнього синтезу у деяких бактеріях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anfinsen C. B. Principles that govern the folding of protein chains // *Science*.—1973.—181.—P. 223—230.
2. Kim P. S., Baldwin R. L. Specific intermediates in the folding reaction of small proteins and the mechanism of protein folding // *Ann. Rev. Biochem.*—1982.—51.—P. 459—489.
3. Jaenicke R. Folding and association of proteins // *Progr. Biophys. and Mol. Biol.*—1987.—49.—P. 117—237.
4. Rietsch A., Belin D., Martin N., Beckwith J. An *in vivo* pathway for disulfide bond isomerization in *Escherichia coli* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1996.—93.—P. 13048—13053.
5. Pelham H. R. B. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins // *Cell*.—1986.—46.—P. 956—961.
6. Gragerov A., Nudler E., Komissarova N., Gaitanaris G. A., Gottesman M. E., Nikiforov V. Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heat shock proteins in preventing protein misfolding in *Escherichia coli* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1992.—89.—P. 10341—10344.
7. Kusukawa N., Yura T. Heat shock protein GroE of *Escherichia coli*: key protective roles against thermal stress // *Genes and Develop.*—1988.—2.—P. 874—882.
8. Goloubinoff P., Gatenby A. A., Lorimer G. H. GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli* // *Nature*.—1989.—337.—P. 44—47.
9. Goloubinoff P., Christeller J. T., Gatenby A. A., Lorimer G. H. Reconstitution of active dimeric ribulose biphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP // *Nature*.—1989.—342.—P. 884—889.
10. Hemmingsen S. M., Woolford C., van der Vies S. M., Tilly K., Dennis D. T., Georgopoulos C. P., Hendrix R. W., Ellis R. J. Homologous plant and bacterial proteins: chaperone oligomeric protein assembly // *Nature*.—1988.—333.—P. 330—334.
11. Laskey R. A., Honda B. M., Mills A. D., Finch J. T. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA // *Nature*.—1978.—275.—P. 416—420.
12. Horwich A. L., Brooks L. A., Fenton W. A., Hirshfield I. N., Furtak K. Folding *in vivo* of bacterial cytoplasmic proteins: role for GroEL // *Cell*.—1993.—74.—P. 909—917.
13. Mogk A., Volker A., Engelmann S., Hecker M., Scumann W., Volker U. Nonnative proteins induce expression of the *Bacillus subtilis* CIRCE regulon // *J. Microbiol.*—1998.—180.—P. 2895—2900.
14. Nover L. Inducers of Hsp synthesis: heat shock and chemical stressors // *Heat shock response* / Ed. L. Nover.—Boca Raton: CPC press, 1991.—P. 5—40.
15. Gupta R. S. Evolutionary relationships of chaperonins // *The chaperonins* / Ed. R. J. Ellis.—New York: Acad. press, 1996.—P. 27—64.
16. Rospert S., Glick B., Jenö P., Schatz G., Todd M. J., Lorimer G. H., Viitanen P. V. Identification and functional analysis of chaperonin 10, the groES homolog from yeast mitochondria // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1993.—90.—P. 10967—10971.
17. Viitanen P. V., Schmidt M., Buchner J., Suzuki T., Vierling E., Dickson R., Lorimer G. H., Gatenby A., Soll J. Functional characterization of the higher plant chloroplast chaperonins // *J. Biol. Chem.*—1995.—270.—P. 18158—18164.
18. Macario A. J., Lange M., Ahring B. K., De Macario E. C. Stress genes and proteins in the archaea // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*—1999.—63.—P. 923—967.
19. Macario A. J., De Macario E. C. The archaeal molecular chaperone machine: peculiarities and paradoxes // *Genetics*.—1999.—152.—P. 1277—1283.
20. Tilly K., Murialdo H., Georgopoulos C. Identification of a second groE gene whose product is necessary for bacteriophage morphogenesis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1981.—78.—P. 1629—1633.
21. Fayet O., Ziegelhoffer T., Georgopoulos C. The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures // *J. Bacteriol.*—1989.—171.—P. 1379—1385.
22. McLennan N., Masters M. GroEL is vital for cell wall synthesis // *Nature*.—1998.—392.—P. 139.
23. Yerko V., Lund P. Gene cpn60-1 coding for one of homologous chaperonins of *Rhizobium leguminosarum* is essential // *Biopolimery i klitina*.—1999.—15.—P. 516—521.
24. Hendrix R. W. Purification and properties of GroE, a host protein involved in bacteriophage assembly // *J. Mol. Biol.*—1979.—129.—P. 375—392.
25. Hohn T., Hohn B., Engel A., Wurtz M., Smith P. R. Isolation and characterization of the host protein Gro involved in bacteriophage lambda assembly // *J. Mol. Biol.*—1979.—129.—P. 359—373.
26. Hutchinson E. G., Tichelaar W., Hofhaus G., Weiss H., Leonard K. Identification and electron microscopic analysis of a chaperonin oligomer from *Neurospora crassa* mitochondria // *EMBO J.*—1989.—8.—P. 1485—1490.
27. Saibil H. R., Zheng D., Roseman A. M., Hunter A. S., Watson G. M. F., Chen S., auf der Mauer A., O'Hara B. P., Wood S. P., Mann N. H. Location of a folding protein and shape changes in GroEL-GroES complexes imaged by cryo-electron microscopy // *Curr. Biol.*—1993.—3.—P. 265—273.
28. Martin J., Goldie K. N., Engel A., Hartl F.-U. Topology of the morphological domains of the chaperonin GroEL visualized by immuno-electron microscopy // *Biol. Chem. Hoppe Seyler*.—1994.—375.—P. 635—639.
29. Roseman A. M., Chen S., White H., Braig K., Saibil H. R. The chaperonin ATPase cycle: mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL // *Cell*.—1996.—87.—P. 241—251.
30. Braig K., Otwinowski Z., Hegde R., Boisvert D. C., Joachimiak A., Horwich A. L., Sigler P. B. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å // *Nature*.—1994.—371.—P. 578—586.
31. Fenton W. A., Kashi Y., Furtak K., Horwich A. L. Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release // *Nature*.—1994.—371.—P. 614—619.
32. Langer T., Pfeifer G., Martin J., Baumeister W., Hartl F. U. Chaperonin-mediated protein folding: GroES binds to one end of the GroEL cylinder which accommodates the protein substrate within its central cavity // *EMBO J.*—1992.—11.—P. 4757—4765.
33. Braig K., Furuya F., Hainfeld J., Horwich A. L. Gold-labeled DHFR binds in the center of GroEL // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1993.—90.—P. 3978—3982.
34. Creighton T. E. *Protein folding* / Ed. W. H. Freeman.—New York, 1992.—P. 519—523.
35. Hammarstrom P., Persson M., Owenius R., Lindgren M., Carlsson U. Protein substrate binding induces conformational changes in the chaperonin GroEL. A suggested mechanism for unfoldase activity // *J. Biol. Chem.*—2000.—275.—P. 22832&
36. Xu Z., Horwich A. L., Sigler P. B. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)7 chaperonin complex // *Nature*.—1997.—388.—P. 741—750.
37. Hayer-Hartl M. K., Ewalt K. L., Hartl F.-U. On the role of symmetrical and asymmetrical chaperonin complexes in assisted protein folding // *Biol. Chem.*—1999.—380.—P. 531—540.

38. Landry S. J., Zeilstra-Ryalls J., Fayet O., Georgopolous C., Gierasch L. M. Characterization of a functionally important mobile domain of GroES // *Nature*.—1993.—364.—P. 255—258.
39. Fenton W. A., Horwich A. L. GroEL-mediated protein folding // *Protein Sci.*—1997.—6.—P. 743—760.
40. Bukau B., Horwich A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines // *Cell*.—1998.—92.—P. 351—366.
41. Horovitz A. Structural aspects of GroEL function // *Curr. Opin. Struct. Biol.*—1998.—8.—P. 93—100.
42. Ben-Zvi A. P., Chatellier J., Fersht A. R., Goloubinoff P. Minimal and optimal mechanisms for GroE-mediated protein folding // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1998.—95.—P. 15275—15280.
43. Jackson G. S., Staniforth R. A., Halsall D. J., Atkinson T., Holbrook J. J., Clarke A. R., Burston S. G. Binding and hydrolysis of nucleotides in the chaperonin catalytic cycle: implications for the mechanism of assisted protein folding // *Biochemistry*.—1993.—32.—P. 2554—2563.
44. Fisher M. T., Yuan X. The rates of commitment to renaturation of rhodanese and glutamine synthetase in the presence of the Gro chaperonins // *J. Biol. Chem.*—1994.—269.—P. 29598—29601.
45. Martin J., Langer T., Boteva R., Schramel A., Horwich A. L., Hartl F.-U. Chaperonin-mediated protein folding at the surface of GroEL through a molten globule-like intermediate // *Nature*.—1991.—352.—P. 36—42.
46. Dubaquié Y., Looser R., Funfschilling U., Jenö P., Rospert S. Identification of *in vivo* substrates of the yeast mitochondrial chaperonins reveals overlapping but non-identical requirement for hsp60 and hsp10 // *EMBO J.*—1998.—17.—P. 5868—5876.
47. Lorimer G. H., Todd M. J., Viitanen P. V. Chaperonins and protein folding: unity and disunity of mechanisms // *Phil. Trans. Roy. Soc. London B*.—1993.—339.—P. 297—304.
48. Viitanen P. V., Gatenby A. A., Lorimer G. H. Purified chaperonin 60 (GroEL) interacts with the non-native states of a multitude of *Escherichia coli* proteins // *Protein Sci.*—1992.—1.—P. 363—369.
49. Ellis J. R., Hartl F.-U. Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function // *FASEB J.*—1996.—10.—P. 20—26.
50. Lorimer G. H. A quantitative assessment of the role of the chaperonin proteins in protein folding *in vivo* // *FASEB J.*—1996.—10.—P. 5—9.
51. Ewalt K. L., Hendrick J. P., Houry W. A., Hartl H.-U. *In vivo* observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system // *Cell*.—1997.—90.—P. 461—500.
52. Houry W. A., Frishman D., Eckerskorn Ch., Lottspeich F., Hartl F.-U. Identification of *in vivo* substrates of the chaperonin GroEL // *Nature*.—1999.—402.—P. 147—154.
53. Rospert S., Looser R., Dubaquié Y., Matouschek A., Glöck B. S., Schatz G. Hsp-independent protein folding in the matrix of yeast mitochondria // *EMBO J.*—1996.—15.—P. 764—774.
54. Dubaquié Y., Looser R., Rospert S. Significance of chaperonin 10-mediated inhibition of ATP hydrolysis by chaperonin 60 // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1997.—94.—P. 9011—9016.
55. Guglielmi G., Mazodier P., Thompson C. J., Davies J. A survey of the heat shock response in four *Streptomyces* species reveals two groEL-like genes and three GroEL-like proteins in *Streptomyces albus* // *J. Bacteriol.*—1991.—173.—P. 7374—7381.
56. De Leon P., Marco S., Isiegas C., Marina A., Carrascosa J. L., Mallado R. P. *Streptomyces lividans* groES, groEL1 and groEL2 genes // *Microbiology*.—1997.—143.—P. 3563—3571.
57. Kong T. H., Coates A. R. M., Butcher P. D., Hickman C. J., Shinnick T. M. *Mycobacterium tuberculosis* expresses two chaperonin-60 homologs // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1993.—90.—P. 2608—2612.
58. Rusanganwa E., Gupta R. S. Cloning and characterization of multiple groEL chaperonin-encoding genes in *Rhizobium meliloti* // *Gene*.—1993.—126.—P. 67—75.
59. Yerko V. N., Downie J. A., Lund P. A. Are the three chaperonin operons of *Rhizobium leguminosarum* essential? // *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century* / Eds C. Elmerich, A. Kondoroski, W. E. Newton.—Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. publ., 1998.—Vol. 31.—P. 248.
60. Babst M., Hennecke H., Fischer H.-M. Two different mechanisms are involved in the heat-shock regulation of chaperonin gene expression in *Bradyrhizobium japonicum* // *Mol. Microbiol.*—1996.—19.—P. 827—839.
61. Єрко В. М., Здоровенко О. Л., Ковальчук М. В. Мутанти *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* за генами синтезу шаперонінів проявляють змінені симбіотичні властивості // *Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть* / Під ред. В. В. Моргуна.—Київ, 2000.—Т. 1.—С. 640—647.
62. Марусич Е. І., Курочкина Л. П., Месянжинов В. В. Шаперони в сборке бактериофага Т4 // *Біохімія*.—1998.—63.—С. 473—482.
63. Betancourt M. R., Thirumalai D. Exploring the kinetic requirements for enhancement of protein folding rates in the GroEL cavity // *J. Mol. Biol.*—1999.—287.—P. 627—644.
64. Byrne G. I., Kalayoglu M. V. *Chlamidia pneumoniae* and atherosclerosis: links to the disease process // *Amer. J.*—1999.—138.—P. 488—490.
65. Paju S., Goulhen F., Asikainen S., Grenier D., Mayrand D., Uitto V.-J. Localization of heat shock proteins in clinical *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains and their effects on epithelial cell proliferation // *FEMS Microbiol. Lett.*—2000.—182.—P. 231—235.
66. Rosenkrands I., Weldingh K., Ravn P., Brandt L., Hojrup P., Rasmussen P. B., Coates A. R., Singh M., Mascagni P., Andersen P. Differential T-cell recognition of native and recombinant *Mycobacterium tuberculosis* GroES // *Infect. Immunol.*—1999.—67.—P. 5552—5558.
67. La Verda D., Albanese L. N., Ruther P. E., Morrison S. G., Morrison R. P., Ault K. A., Byrne G. I. Seroreactivity to *Chlamydia trachomatis* Hsp10 correlates with severity of human genital tract disease // *Infect. Immunol.*—2000.—68.—P. 303—309.
68. Hoffman P. S., Garduno R. A. Surface-associated heat shock proteins of *Legionella pneumophila* and *Helicobacter pylori*: roles in pathogenesis and immunity // *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*—1999.—7.—P. 58—63.
69. Chua-Intra B., Peerapakorn S., Davey N., Jurcevic S., Busson M., Vordermeier H. M., Pirayavaraporn C., Ivanyi J. T-cell recognition of mycobacterial GroES peptides in *Thai* leprosy patients and contacts // *Infect. Immunol.*—1998.—66.—P. 4903—4909.
70. Kong T. H., Coates A. R., Butcher P. D., Hickman C. J., Shinnick T. M. *Mycobacterium tuberculosis* expresses two chaperonin-60 homologs // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1993.—90.—P. 2608—2612.
71. Zaborina O., Misra N., Kostal J., Kamath S., Kapatal V., El-Idrissi M. E., Prabhakar B. S., Chakrabarty A. M. P2Z-independent and P2Z receptor-mediated macrophage killing by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients // *Infect. Immunol.*—1999.—67.—P. 5231—5242.

УДК 577.112:577.21

Надійшла до редакції 06.07.2000