

СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ШАПЕРОНА GroEL

Гришкова М. В.^{1,2}

¹Федеральное государственное учреждение наук Институт Биоорганической химии им. Академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия (117997, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10), e-mail: mgrishkova@yandex.ru

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский педагогический государственный университет», Москва, Россия (119991, ГСП-1, ул. М. Пироговская, д. 1, стр.1)

Впервые шапероны и их функции в процессе фолдинга были изучены на примере белков *Escherichia coli* GroEL и GroES. За последние несколько лет было проведено большое количество исследований, направленных на изучение структурных и функциональных особенностей молекулярного шаперона GroEL. Согласно последним данным, GroEL взаимодействует с ненативными белками, предотвращая их неправильное сворачивание и агрегацию. Предполагается, что этот процесс состоит из трёх стадий: вначале GroEL захватывает полипептидную цепь, затем образуются связи между GroES и АТФ, после этого белок оказывается внутри шаперона и происходит фолдинг данного белка. После гидролиза АТФ в раствор высвобождается полипептид. В обзоре обобщены сведения о строении и функциях молекулярного шаперона GroEL.

Ключевые слова: шаперон, шаперонин, GroEL, фолдинг.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL FEATURES OF CHAPERON GroEL

Grishkova M. V.^{1,2}

¹Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia (Miklukho-Maklaya St. 16/10 SP-7, 117997), e-mail: mgrishkova@yandex.ru

²Moscow State Pedagogical University, Moscow, Russia, (M.Pirogovskaya St., 1h, 1b, 119991)

First chaperones and their functions in the process of folding have been studied on the example of protein *Escherichia coli* - GroEL and GroES. Over the past few years there were a lot of studies of the structural and functional features of the molecular chaperone GroEL. According to the latest data GroEL interacts with non-native proteins, preventing their misfolding and aggregation. It is assumed that this process consists of three stages: first, GroEL captures polipeptid chain, then the links between GroES and ATP, then the protein is inside the chaperone and folding of the protein occurs. After hydrolysis of ATP, the solution is released polypeptide. This review summarizes information about the structure and functions of the molecular chaperone GroEL.

Key words: chaperon, chaperonin, GroEL, folding.

Полипептидные цепи в процессе трансляции приобретают высокоспецифичную пространственную структуру, которая полностью формируется после завершения биосинтеза. Процесс сворачивания полипептидной цепи в пространственную структуру получил название фолдинга (от англ. folding) [10;12]. Доказано, что в клетке существует особая категория белков, основной функцией которых является обеспечение правильного сворачивания полипептидных цепей в нативную структуру [12]. Эти белки, связываясь с развернутой или частично развернутой конформацией полипептидной цепи, не дают ей образовать неправильные структуры. Они удерживают частично развернутый белок, способствуют его переносу в разные субклеточные образования и создают условия для его эффективного сворачивания. Эти белки получили название "молекулярные шапероны" [6].

К настоящему времени описано несколько классов шаперонов, которые различаются по структуре и специфическим функциям. Все шапероны являются "белками теплового шока"

(heat shock proteins, hsp), синтез которых резко увеличивается во время клеточного стресса [22]. Но и при нормальных условиях большинство белков этого семейства синтезируются довольно интенсивно. Широкий диапазон функций шаперонов включает стабилизацию промежуточных конформаций в процессе созревания белков *in vivo*, ассистирование сборки олигомерных комплексов, участие в трансмембранном транспорте белков и деградации коротко живущих белков цитозоля, а также предотвращение летальной неспецифической ассоциации белков во время клеточного стресса [24;22].

В 80-е годы сложилось представление, согласно которому определенные белковые факторы могут играть весьма важную роль в процессах формирования и поддержания нативной конформации белка в клетке. Эллис сформулировал идею ассистируемой самоорганизации белков в противоположность спонтанной. Эта концепция предполагает, что, хотя сворачивание белков является спонтанным процессом, существуют критические стадии, на которых принимают обязательное участие специальные клеточные факторы. Роль таких факторов, названных молекулярными шаперонами, состоит в обеспечении оптимальных условий для протекания процесса сворачивания белков путем устранения «помех» или «неадекватных контактов» [8].

Классификация шаперонов основана на величине молекулярной массы составляющих их полипептидных цепей (субъединиц), которая варьирует от 10 кДа (килодальтонов) (для белка hsp10) до 90 кДа (для белка hsp90) и выше. По характеру выполняемых этими белками функций их можно разделить на два больших семейства – шапероны, или hsp70, и шаперонины, к которым относятся hsp60 и hsp10 [1].

Молекулярные шапероны обеспечивают фолдинг примерно половины синтезирующихся внутриклеточных белков. Роль шапероновой системы в сохранности клеточного протеома особенно возрастает в условиях стресса [22].

Одним из наиболее полно исследованных молекулярных шаперонов является 14-ти субъединичный белок теплового шока клеток *E. coli* GroEL, представитель семейства шаперонинов, обнаруженных в эубактериях, митохондриях и хлоропластах. Впервые шаперон GroEL был обнаружен в клетках *Escherichia coli* в начале 70-х годов [4, 16, 22]. Было доказано, что он способен нековалентно связываться с мономерной формой белка В фага лямбда, обеспечивая сборку головки фага. GroEL принадлежит к числу доминирующих белков при нормальных условиях в клетках *E. coli*. Но в условиях стресса количество этого белка в клетке резко возрастает [16]. GroEL взаимодействует с ненативными конформационными состояниями различных белков, предотвращая их неправильное сворачивание и агрегацию, и обладает слабой АТФ-азной активностью [2;27].

При этом нарушения экспрессии гена GroEL приводят к гибели клеток [30]. GroEL не обладает специфичностью по отношению к белковым мишеням.

Исследований *in vitro* показали, что около 50 % белков из экстракта клеток *E. coli*, будучи денатурированными, взаимодействуют с GroEL [7]. При этом более 30 % различных белков не способны свернуться в нативное состояние при отсутствии в клетке GroEL [3]. Эксперименты по ренатурации белков *in vitro* показали, что GroEL увеличивает выход нативного белка, ингибируя агрегацию несвернутых белков [1]. Часто для осуществления своей функции GroEL необходимо взаимодействовать с другим олигомерным белком теплового шока GroES (hsp10) [14; 18;23].

Каждая субъединица гептамерного «кольца» GroEL (M 57 кДа) состоит из трех доменов: апикального («верхушечного»), содержащего общий центр связывания ненативных белков и кошаперонина, шарнирного промежуточного и С-концевого экваториального, несущего АТФ-азный центр. Экваториальные домены обеспечивают большую часть межсубъединичных контактов как внутри гептамерного кольца, так и между кольцами шаперона. Взаимодействие экваториальных доменов двух колец GroEL приводит к образованию зеркально симметричного тороида с двумя изолированными гидрофобными полостями (транс-состояние колец), входные отверстия которых сформированы апикальными доменами [18]. Субъединицы кошаперонина GroES (M 10 кДа) также образуют циклический гептамерный куполообразный комплекс, способный прикрывать один из торцов тороида GroEL. Это приводит к значительным конформационным изменениям шаперонина, увеличению размеров полости и ее гидрофилизации (цис-состояние кольца). Взаимодействие ненативных полипептидов с тремя или четырьмя из семи гидрофобных центров Ар-доменов фиксирует белок-мишень на открытом транс-кольце GroEL [25;26]. При этом в соседнем цис-кольце происходит гидролиз АТФ и рефолдинг ранее связанной мишени. Образование ADP в цис-кольце способствует кооперативному связыванию АТФ во всех экваториальных доменах транс-кольца, что приводит к снижению гидрофобности Ар-доменов [28] и освобождению мишени [28]. Одновременно происходит быстрое связывание кошаперонина GroES и переход кольца в цис-состояние, сопровождающийся инкапсулированием мишени в гидрофильную полость, где агрегация белка становится невозможной. Эти превращения индуцируют быстрое высвобождение сначала GroES и рефолдированной мишени, а затем ADP из соседнего кольца и приводят к активации гидролиза АТФ и рефолдинга мишени в цис-кольце. При этом мишень претерпевает ряд структурных изменений, включая стадию разворачивания [18].

Предполагается, что ускорение фолдинга мишени во внутренней камере комплекса GroEL–GroES обеспечивается ограничением конформационного пространства и связанным с ним

изменением энергетического профиля процесса, что позволяет мишени достичь нативного состояния [18]. Параллельно происходит присоединение новой молекулы мишени в соседнем кольце, начинающее очередной цикл рефолдинга белка. Существует возможность взаимодействия белка-мишени и с ADP-связанной формой транс-кольца GroEL.

Представленный выше цис-механизм фолдинга реализуется по отношению к относительно небольшим мишеням, способным разместиться внутри полости цис-кольца системы GroEL–GroES. Крупные белки, инкапсулирование которых невозможно, подвергаются фолдингу по транс-механизму, согласно которому связывание мишени и кошаперонина GroES происходит на противоположных кольцах GroEL [6]. Продуктивный фолдинг осуществляется во время пребывания мишени в окружающей среде между этапами ее высвобождения и повторного связывания шаперонином [8]. Фолдинг по транс-механизму осложняется вероятностью агрегации промежуточных форм рефолдируемых мишеней и по эффективности заметно отстает от фолдинга по цис-механизму. Транс-фолдинг системой GroEL–GroES реализуется для мультидоменных белковых мишеней [18].

Функционирование шаперонинов, регулируемое гидролизом АТФ, характеризуется тремя основными признаками [24;26]: отрицательной кооперативностью между кольцами GroEL, определяющей асимметричное функционирование системы, неконкурентным ингибированием гидролиза АТФ при наличии ADP в смежном кольце и необходимостью наличия связанного нуклеотида в шаперонине GroEL для реализации связывания кошаперонина GroES [1].

Белковым субстратом молекулярного шаперона GroEL является в той или иной степени развернутая, ненативная полипептидная цепь. Шаперонины способны связывать как небольшие (~2 кДа) неструктурированные полипептиды, так и крупные (до 100 кДа) белки, находящиеся в денатурированном состоянии [1;29]. Белки могут находиться в ненативном состоянии как в процессе или сразу после завершения их синтеза на рибосоме, так и вследствие воздействия повышенной температуры или других денатурирующих факторов на зрелые белки. Комплекс стабилизируется в основном гидрофобными взаимодействиями [15]. Дополнительный вклад вносят также электростатические взаимодействия (средство GroEL к своим белковым субстратам меняется в зависимости от ионных условий среды) [27]. При исследовании взаимодействия GroEL с различными аминокислотами было показано, что GroEL прочнее всего взаимодействует с гидрофобными аминокислотами (Ile, Phe, Val, Leu, Trp). Однако GroEL взаимодействует и с менее гидрофобными и даже с заряженными аминокислотами (Ala, Tyr, Thr, Glu, Gln, His, Lys, Arg, Pro). GroEL может связывать полипептиды, имеющие как вытянутую (β -участки), так и α -спиральную конформации, содержащие не только гидрофобные, но и полярные аминокислотные остатки [13;9].

Из всего вышесказанного можно сделать вывод, что GroEL не обладает специфичностью к определенным аминокислотным остаткам или структурным элементам своих полипептидных мишеней. Полипептидные цепи могут связываться с GroEL, как правило, содержа слабо упакованные элементы вторичной структуры.

Степень сродства GroEL к ненативным белкам определяется балансом гидрофобных и электростатических взаимодействий, который может регулироваться лигандами GroEL, и внешними условиями (температурой, ионной силой и pH раствора и так далее) [1;24].

GroEL выполняет функции шаперона за счёт взаимодействий с рядом лигандов: ионами K⁺ и Mg²⁺, адениловыми нуклеотидами (АДФ и АТФ) и с меньшим по размеру кошаперонином GroES [20]. Свободный GroEL обладает слабой АТФ-азной активностью при наличии ионов K⁺ в растворе [18]. Низкомолекулярные лиганды (адениловые нуклеотиды), взаимодействуя с GroEL в присутствии ионов Mg²⁺, способны понижать константу связывания с ним белковых мишеней.

GroES присутствует в клетке в эквимоллярных концентрациях к GroEL. При таких условиях GroES в присутствии АТФ склонен к быстрому связыванию с GroEL с образованием асимметричного комплекса GroEL–GroES [19]. Следовательно, можно предположить, что в клетке в обычном состоянии одно из колец каждой молекулы GroEL связано с GroES [20].

В начале 90-х годов была предложена модель шаперонин-ассистируемого сворачивания белков в так называемой «ячейке Анфинсена» («Anfinsen cage»), образованной полостью одного из колец GroEL и «куполом» GroES, что устраняет нежелательные контакты сворачивающихся белковых молекул друг с другом и с иными молекулами [5;9]. Эта модель впоследствии не раз дополнялась и в настоящее время является наиболее популярной [12;27;29;31]. Согласно этой концепции ненативный белок связывается во внутренней полости GroEL с противоположной стороны от ассоциированного GroES. Связывание белковой мишени приводит к диссоциации GroES, а GroES совместно с АТФ повторно связываются с GroEL (на этот раз с кольцом, ассоциированным с белком).

При этом кооперативный гидролиз семи молекул АТФ одним кольцом GroEL приводит к повышению его сродства к GroES, и белковая мишень, находящаяся в *cis*-положении к GroES, становится способной к дальнейшему сворачиванию, что приводит к увеличению сродства *trans*-кольца GroEL к АТФ. Гидролиз АТФ на *trans*-кольце GroEL приводит к диссоциации GroES и освобождению свернутого белка, а последующая посадка белковой мишени ведет к началу нового цикла. Таким образом, GroEL функционирует как молекулярная «машина», управляемая своими лигандами, взаимодействие с которыми приводит к аллостерическим конформационным изменениям структуры шаперона и определяет различные стадии цикла. Сворачивание белка происходит спонтанно во

внутренней полости GroEL под крышкой GroES («ячейка Анфинсена»). Если белок не сворачивается, цикл повторяется.

При этом стоит отметить, что GroEL способен ассистировать сворачивание ряда белков *in vitro* не только в отсутствие GroES, но и в отсутствие гидролиза АТФ.

Модель предполагает, что GroEL-частица может связывать разнообразные полипептидные мишени на обеих своих торцевых поверхностях. Количество связанных полипептидов зависит от их размера, а прочность связывания с GroEL определяется их «гидрофобностью» и зарядом. Таким образом, концентрация несвернутых полипептидов в свободном состоянии понижается, что должно приводить к уменьшению вероятности их неспецифической ассоциации. Тем не менее полипептиды могут диссоциировать с поверхности GroEL и приобретать нативную конформацию или взаимодействовать с другими клеточными факторами в свободном состоянии [10;11]. Лиганды GroEL (Mg-АДФ, Mg-АТФ и кошаперонин GroES) в различной степени ослабляют его взаимодействие с полипептидными мишенями, увеличивая тем самым время пребывания этих мишеней в свободном состоянии и, следовательно, вероятность приобретения ими нативной структуры [1]. При этом даже в присутствии лигандов GroEL способен взаимодействовать с не свернувшимися полипептидными цепями, уменьшая тем самым вероятность их неспецифической межмолекулярной ассоциации [18].

Функция шаперонинов сводится к «удержанию» около себя белков, находящихся в «гидрофобных» промежуточных состояниях, и тем самым к уменьшению вероятности их неспецифической ассоциации. Лиганды шаперонинов понижают их сродство к ненативным полипептидным цепям, предотвращая формирование «долгоживущих» комплексов, которые невыгодны для быстрого восстановления клеточных процессов после стресса. Кроме того, шаперонины должны «защищать» самих себя от неспецифической ассоциации по этим «гидрофобным» центрам [1].

Возможно, именно поэтому шапероны эволюционировали как небольшие олигомерные комплексы, сильно заряженные при нейтральных рН и обладающие хорошей растворимостью даже при больших концентрациях. Дальнейшее изучение свойств как мономерных, так и олигомерных шаперонов из различных организмов позволит более определенно выяснить механизмы участия шаперонов в процессе фолдинга.

Список литературы

1. Марченков В. В., Марченко Н. Ю., Марченкова С. Ю., Семисотнов Г. В. // Успехи биологической химии. – 2006. – Т. 46. – С. 279-302.
2. Мельников Э. Э., Ротанова Т. В. Молекулярные шапероны // Биоорганическая химия. – 2010. – Т.36 (1). – С. 5-14.

3. Azia A., Unger R., Horovitz A. What distinguishes GroEL substrates from other *Escherichia coli* proteins? // *FEBS Journal*. – 2012. – Vol.279. – P. 543-550.
4. Bochkareva E. S., Lissin N. M., Girshovich A. S., Transient association of newly synthesized unfolded proteins with the heat-shock GroEL protein // *Nature*. – 1988. – Vol. 336. – P.254-257.
5. Chen L., Sigler P. B. The Crystal Structure of a GroEL / Peptide Complex:Plasticity as a Basis for Substrate Diversity // *Cell*. – 1996. – Vol.99. – P. 757-768.
6. Dobson C. M. Principles of protein folding, misfolding and aggregation // *Semin. Cell.Dev. Biol.* –2004. – Vol.15. – P.3-16.
7. Clark G. W., Tillier E. R. Loss and gain of GroEL in the Mollicutes // *Biochem. Cell Biol.* – 2010. – Vol.88. – P. 185-194.
8. Ellis J., Proteins as molecular chaperones // *Nature*. – 1987. – Vol.328 (6129). – P.378-379.
9. Ewalt K. L., Hendrick J. P., Houry W. A., Hartl F. U. *In vivo* observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system // *Cell*. – 1997. – Vol.90. – P. 491-500.
10. Feltham J. L., Gierasch L. M. GroEL–Substrate Interactions: Molding the Fold, or Folding the Mold? // *Cell*. – 2000. – Vol. 100. – P.193-196.
11. Fenton W. A., Horwich A. L., GroEL-mediated protein folding // *Protein Sci.* – 1997. – Vol. 6. – P. 743-760.
12. Gething M. J., Sambrook J., Protein folding in the cell // *Nature*. – 1992. – Vol.355. – P. 33-45.
13. Gomez-Puertas P., Martin-Benito J., Carrascosa J. L., Willison K. R., Valpuesta J. M. The substrate recognition mechanisms in chaperonins – Review // *Journal of Molecular Recognition*. – 2004. – Vol. 17. – P. 85-94.
14. Grallert H., Buchner J. Structural View of the GroEL Chaperone Cycle // *Journal of Structural Biology*. – 2001. – Vol.135. – P. 95-103.
15. Hayes S. A., Dice J. F. Roles of Molecular Chaperones in Protein Degradation // *The Journal of Cell Biology*. – 1996. – Vol.132. – P. 255-258.
16. 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. – Vol. 333. – P. 330-334.
17. Hendrick J. P. Hartl F. U. The role of molecular chaperones in protein folding // *FASEB J.* – 1995. – Vol. 9(15). – P.1559-1569.
18. Horwich A. L., Farr G. W., Fenton W. A. GroEL-GroES-Mediated Protein Folding // *Chemical Reviews*. – 2006. – Vol. 106. – P. 1917-1930.
19. Jewett A. I., Shea J. E. Reconciling theories of chaperonin accelerated folding with experimental evidence // *Cell. Mol. Life Science*. – 2010. – Vol.67. – P. 255-276.

20. Kusakawa N., Yura T., Ueguchi C., Akiyama Y., Ito K., Effects of mutations in heat-shock genes groES and groEL on protein export in Escherichia-coli // EMBO J. – 1989. – Vol.8(11). – P. 3517-3521.
21. Lin Z., Rye H. S. GroEL-Mediated Protein Folding: Making the Impossible, Possible // Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. – 2006. – Vol.41. – P. 211-239.
22. Lindquist S., Craig E.A., The heat-shock proteins // Annu. Rev. Genet. – 1988. – Vol.22. – P. 631-77.
23. Lund P.A. Multiple chaperonins in bacteria -why so many? // FEMS Microbiol Rev. – 2009. – Vol. 33. – P. 785-800.
24. Marchenkov V. V., Semisotnov G. V. GroEL. Assisted Protein Folding: Does It Occur Within the Chaperonin Inner Cavity? // International Journal of Molecular Sciences. – 2009. – Vol. 10. – P. 2066-2083.
25. Paul S., Punam S., Chaudhuri T. K. Chaperone-assisted refolding of Escherichia coli maltodextrin glucosidase // FEBS Journal. – 2007. – Vol. 274. – P. 6000-6010.
26. Radford S. E. GroEL: More than Just a Folding Cage // Cell. – 2006. – Vol. 125. – P. 831-833.
27. Sparrer H., Lilie H., Buchner J. Dynamics of the GroEL–Protein Complex: Effects of Nucleotides and Folding Mutants // J. Mol. Biol. – 1996. – Vol.258. – P. 74-87.
28. Thirumalai D., Lorimer G. H. Chaperonin – mediated protein folding // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. – 2001. – Vol.30. – P. 245-269.
29. Viitanen P. V., Donaldson G. K., George H. L., Lubben T. H., Gatenby A. A. Complex interactions between the chaperonin 60 molecular chaperone and dihydrofolate reductase // Biochemistry. – 1991. – Vol. 30 (40). – P. 9716-9723.
30. Walter S. Structure and function of the GroEL chaperone // Cell. Mol. Life Sci. – 2002. – Vol. 59. – P. 1589–1597.
31. Weissman J. S., Rye H. S., Fenton W. A., Beechem J. M., Horwich A. L. Characterization of the Active Intermediate of a GroEL–GroES-Mediated Protein Folding Reaction // Cell. – 1996. – Vol. 84(3). – P.481-490.

Рецензенты:

Севастьянова Г. А., д.б.н., профессор ФГБОУ ВПО «Московский педагогический государственный университет», г. Москва.

Ротанова Т. В., д.х.н., профессор, ведущий научный сотрудник ФГУ науки Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, РАН, г. Москва.