

Hsp27	382
Hsp60	383
Hsp70	384
Hsp70B'	385
Hsp90α	385

NEW

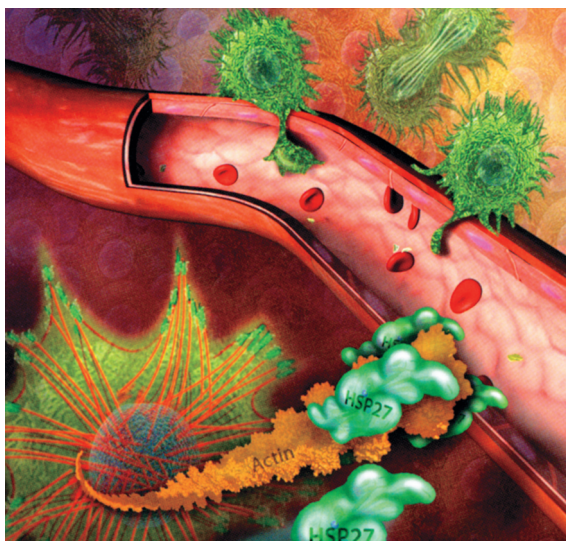
сокращения раздела:

АФК – активные формы кислорода
РА – ревматоидный артрит

РВВ – рецидивирующий вульвовагинит
СКВ – системная красная волчанка

Ig – иммуноглобулины
HSP – белки теплового шока

В 1974 году Тиссиерес и соавт. впервые обнаружили, что в ответ на повышение температуры среды у личинок дрозофилы происходит активация синтеза специфической группы белков. Эта группа белков получила название белков теплового шока (*heat shock proteins, Hsp*). Позже было установлено, что синтез Hsp индуцируется не только при повышении температуры, но и при многих других неблагоприятных воздействиях, таких как добавление к клеткам органических растворителей, тяжелых металлов, сильных оксидантов, а также под влиянием некоторых гормонов и ростовых факторов. В связи с этим некоторые авторы называют Hsp стресс-белками.



В эволюционном отношении Hsp относятся к высококонсервативным белкам и обнаруживаются во всех организмах от бактерий до человека. Это свидетель-

ствует о том, что они выполняют фундаментальные клеточные функции. Как цитопротекторные свойства стресс-белков, так и их роль в процессах нормальной жизнедеятельности клетки во многом определяется тем, что эти белки являются шаперонами. Шапероны – это белки, которые облегчают формирование вторичной и третичной структуры других белков. Hsp также участвуют в процессах репарации или элиминации неправильно свернутых или денатурированных белков.

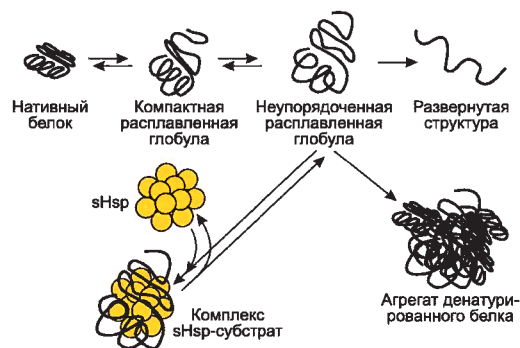
Согласно современной классификации выделяют семь (в последнее время говорится даже о восьми) типов sHsp, которые разделяют либо по м.м., либо по выполняемым в клетке функциям. Различают малые Hsp (small Hsp, sHsp) с м.м. 25/27 кДа, 22 и 20 кДа, а также высокомолекулярные Hsp110, 100, 90, 70, 60, 40. По характеру синтеза Hsp (подобно NO-синтазе*) подразделяются на конститутивные и индуцибельные. Конститутивные Hsp синтезируются в клетке постоянно, и для их активации не требуется воздействия на клетку повреждающего фактора, т.е. синтез их при стрессе не увеличивается.

* NO-синтаза – см. раздел «Факторы роста» стр. 392

Синтез индуцибельных Hsp начинается вскоре после воздействия на клетку повреждающего агента. Данные, полученные *in vivo*, свидетельствуют о том, что разделение Hsp на конститутивные и индуцибельные в человеческом организме достаточно условно, т.к. их синтез зависит от специализации и функциональной активности клеток. Каждый из охарактеризованных Hsp выполняет специфические функции. Так, белки семейства Hsp70 (как и их бактериальный аналог DnaK), взаимодействуют с вновь синтезируемой на рибосомах полипептидной цепью, предотвращают преждевременное неправильное сворачивание незрелой полипептидной цепи и участвуют в транспорте белка к определенным органеллам (митохондриям, эндоплазматическому ретикулуму и т.д.). Hsp100 очень близок Hsp70 и выполняет защитную функцию, предохраняя организм в условиях стресса. Hsp90 образуют сложный комплекс с несколькими вспомогательными белками (т.н. кошаперонами). Такой комплекс взаимодействует с рецепторами стероидных гормонов, обеспечивает их эффективное связывание с рецепторами и последующий перенос гормон-рецепторного комплекса в ядро. Помимо этого, Hsp90 участвуют в направленном переносе нескольких типов протеинкиназ к участкам их функционирования. Hsp60 могут участвовать в фолдинге сложно устроенных многодоменных белков (таких как актин или тубулин), а также в АТФ-зависимом исправлении ошибок в структуре частично денатурированных белков. К последней группе белков теплового шока относятся sHsp, выполняющие множество разных функций в клетке.

Известно, что накопление белковых агрегатов, являющееся результатом их неправильного сворачивания, сопровождается рядом заболеваний, таких как катаракта, цирроз печени, некоторые виды миопатий, губчатые энцефалопатии (болезнь Куру, болезнь Крейтцфельда-Якоба), нейродегенеративные болезни и др. При болезни Паркинсона в клетках обнаруживаются так называемые тельца Леви, состоящие из sHsp и нейрофиламентов, а цирроз печени сопровождается накоплением телец Маллори, образованных кератиновыми филаментами и sHsp. Зачастую агрегаты неправильно свернутых белков образуют β-амилоидные структуры, которые очень устойчивы к протеолизу и не могут быть удалены из клетки. Агрегаты белков, накапливающиеся внутри клетки или в межклеточном пространстве, невыясненным пока механизмом оказывают повреждающее влияние и приводят к гибели клеток. Детальное исследование взаимодействия sHsp с белками промежуточных филаментов может дать ключ к пониманию молекулярных механизмов развития вышеперечисленных заболеваний. Повышенный синтез sHsp наблюдается не только в клетках, в которых происходит накопление нерастворимых белковых агрегатов, но и в клетках, подвергшихся воздействию различных неблагоприятных факторов.

Особое внимание уделяется проблеме неспецифического ответа клетки на повреждение, так как предполагается, что между стресс-контролем и контролем роста и дифференцировки клеток существуют тесные взаимосвязи. Hsp участвуют в формировании явления перекрестной резистентности и феномена адаптивной стабилизации структур, в восстановлении нативной конформации белковых молекул, в восстановлении активности ферментов и, наконец, они взаимодействуют с антиоксидантной системой и системой генерации оксида азота. Система Hsp является одним из обязательных звеньев неспецифического ответа клетки на повреждение, и в организме человека эта система находится под нейрогуморальным контролем. Было доказано, что Hsp опосредуют действие глюко-, минералокортикоидов и половых гормонов. В настоящее время кортикостероидам придается решающее значение в координации взаимодействия эндокринной и иммунной систем при стрессе. Поэтому участие отдельных Hsp в рецепции кортикостероидов и стероидогенезе может предопределять связь между внутриклеточной эндогенной системой защиты, к которой относится система Hsp и центральным звеном общего адаптационного синдрома при стрессе.* Hsp, как шапероны, участвуют в синтезе гликопротеинов, к которым относится тиреоглобулин, причем механизмы стрессорной активации синтеза белков теплового шока характеризуются высокой тканевой специфичностью.



Предполагаемый механизм взаимодействия малых белков теплового шока с частично денатурированными белками (Lindner R.A., Treweek T.M., Car-ver J.A., 2001)

Белок теплового шока Hsp27

Hsp27 человека – это член высоко консервативного семейства белков Hsp млекопитающих. Hsp27 конститутивно экспрессируется во многих тканях и его экспрессия повышается до максимального уровня после стресса различных видов, включая повышение температуры, контакт с токсичными металлами, химическими веществами и оксидантами. Hsp27 колокализуется с актино-

* **Гормоны надпочечников – см. раздел «Гормоны коры надпочечников», стр. 127**

выми филаментами в сердечных, скелетных и гладких мышцах. Он существует в виде больших олигомеров, которые предположительно обладают шаперон-подобной активностью, и в виде меньших олигомеров, которые закрывают конец мирофиламента и стабилизируют его. Показано, что Hsp27 играет важную роль во многих клеточных функциях, таких как выживание клетки во время стресса, апоптоз и реорганизация микрофиламентов при ответе на ростовые факторы или стресс, а также в сокращении гладкой мускулатуры. В ответ на тепловой шок и другие различные стимулы, такие как цитокины, факторы роста и пептидные гормоны происходит фосфорилирование Hsp27. Фосфорилирование обусловлено активацией сигнального пути p38 MAP киназы с непосредственным участием киназа-активируемой протеин киназы-2 (МАРКАРК-2). Прямым следствием фосфорилирования Hsp27 является снижение олигомеризации и изменение колокализации этого белка с активными филаментами.

По данным ряда авторов оксидативный стресс сопровождается усиленным синтезом sHsp*. Большая часть исследователей склоняется к заключению, что sHsp защищают клетку от окислительного шока, хотя в литературе высказывается и противоположная точка зрения. Предполагают, что sHsp каким-то образом активируют или стабилизируют глюкозо-6-фосфат дегидрогеназу, фермент, продуктом которого является NADPH. Повышение уровня NADPH увеличивает активность глутатион-редуктазы, а это, в свою очередь, обеспечивает поддержание нормального уровня восстановленного глутатиона. В опытах, проведенных с животными, имеющими точечные мутации Hsp27, было установлено, что защитный эффект против окислительного шока проявляют только формы Hsp27, способные образовывать крупные олигомерные комплексы. Мутации, имитирующие фосфорилирование и приводящие к диссоциации крупных олигомеров, вызывают существенное уменьшение защитного эффекта Hsp27.

В зависимости от концентрации образовавшихся активных форм кислорода (АФК) окислительный стресс в конечном итоге ведет либо к некрозу, либо к апоптозу. Высокий уровень АФК вызывает сильное повреждение белков, липидов, нуклеиновых кислот, следствием чего является некроз. Умеренный окислительный стресс вызывает программируемую гибель клеток, т.е. приводит к апоптозу. Результаты одной из работ, выполненной на культуре эмбриональных фибробластов крысы, свидетельствуют о том, что Hsp27 препятствует некрозу, но не влияет на апоптоз. По мнению авторов, защитный эффект был связан с вызванной Hsp27 стабилизацией актиновых филаментов. Однако накапливается все больше данных о возможном участии sHsp в регуляции апоптоза.

В некоторых злокачественных опухолях заметно повышен уровень экспрессии Hsp27, что коррелирует с ускоренным метастазированием и неблагоприятным исходом болезни. Напротив, при обнаружении в крови онкологических больных антител к Hsp27, выживаемость была выше.**

Белок теплового шока Hsp60

Hsp60 – это молекулярный шаперон, который участвует в фолдинге и сборке митохондриальных белков и облегчает протеолитическую деградацию неправильно свернувшихся или денатурированных белков. Hsp60 – член высоко консервативного семейства, включающего молекулярные шапероны нескольких видов, такие как Hsp60 растений (также известный как связывающий белок Рубиско), GroEL, *E. coli* Hsp60 и Hsp65, основной антиген микобактерий. Hsp60 строго зависит от своего кошаперона – Hsp10, который связывается с ними и регулирует его субстрат-связывающую и АТФ-азную активности. Hsp60 быстро активируется при окислительном стрессе, вирусных инфекциях, химических веществах, повышении температуры и излучении. Hsp60 кодируется ядерной ДНК и синтезируется в виде большого предшественника, содержащего N-концевую последовательность, необходимую для переноса в митохондрии, а затем расщепляющегося до зрелой формы белка на митохондриальном матриксе. Hsp60 в основном локализован в митохондриях, но были показаны изменения в его внутриклеточной локализации и экспрессия на клеточной поверхности. Hsp60 был выявлен в нормальной человеческой сыворотке, было показано нарастающее снижение уровня Hsp60 в сыворотке с возрастом. Для понимания причин такого снижения и роли Hsp60 в поддержании гомеостаза и устойчивости к условиям окружающей среды требуются дополнительные исследования.

Уровни циркулирующего Hsp60 связаны с ранней сердечно-сосудистой патологией и с физиологическим дистрессом у женщин. Кроме того, существует значительная положительная ассоциация между уровнями сывороточных Hsp60 и ФНОα. Hsp60 являются антигенными мишенями для Т-клеток в атеросклеротических бляшках, в связи с чем существует прямая корреляция между уровнем растворимого белка (sHsp60) и развитием атеросклероза. Была отмечена высокая встречаемость sHsp60 и Hsp70 у женщин с рецидивирующим вульвовагинитом (pVV) и текущим бактериальным вагинитом или вагинальным кандидозом. Это подтверждает, что разница в индукции белков теплового шока может относиться к восприимчивости к pVV инфекциям. Кроме того, была выявлена экспрессия Hsp60 в перитонеальной жидкости женщин с эндометриозом, что указывает на то, что Hsp60 может высвобождаться вследствие имплантации эктопического эндометрия. Анализ кривой

*Оксидативный стресс – см. раздел «Маркеры воспаления и оксидативного стресса», стр 355

** см. раздел «Апоптоз», стр. 432

выживаемости 247 пациенток с эпителиальной карциномой яичника показал значительную разницу в благоприятном исходе для опухолей, экспрессирующих Hsp60 (медиана выживаемости 37 месяцев по сравнению с 28 месяцами для опухолей, не экспрессирующих Hsp60).

Количественное определение уровня Hsp60 в клетках различных типов и биологических жидкостях может добавить новую информацию о физиологической роли этого белка при широком спектре патологий и очевидно позволит выявить новые маркеры прогноза и тяжести заболевания.

Белок теплового шока Hsp70

У человека существует не менее 11 генов семейства Hsp70, которые кодируют группу близких белков с молекулярной массой от 66 до 78 кДа. Базовый уровень экспрессии и индуцибельность в ответ на различные факторы стресса различаются для множества членов этого семейства. Шапероны Hsp70 имеют два основных функциональных домена. Высоко консервативный NH₂-концевой домен обладает АТФ-азной активностью и прочно связывается с АДФ и АТФ, а COOH-терминальный домен связывается с полипептидами. Известно, что Hsp70 предпочтительно связывается с несвернутыми или частично свернутыми белками и предотвращает их агрегацию или неправильный фолдинг. Номенклатура различных белков семейства Hsp70 обширна и основана на клеточном распределении и индуцируемости.

Индукцибельный Hsp70 – это белок, экспрессия которого активируется при попадании клетки или организма в условия стресса. Hsp70 необходим для клеточного восстановления, выживания и обеспечения нормальных клеточных функций. Он также является молекулярным шапероном, который предотвращает агрегацию белков и восстанавливает поврежденные белки в ответ на клеточный стресс, вызванный неблагоприятными воздействиями окружающей среды, патогенами и заболеваниями. В настоящее время проводятся исследования с целью применения протективных возможностей Hsp70 для терапевтических целей.

Молекула Hsp70 представляет собой димер, обладает способностью формировать высокоолигомерные комплексы со многими структурами в клетке и имеет по меньшей мере 8 изоформ, набор и концентрация которых зависят от типа клетки и контролируются видом стрессорного воздействия. У людей и приматов инициация синтеза HSP при стрессе связана с активацией, по меньшей мере, трех рецепторных систем: Ca-мобилизующих, β-адренорецепторов и рецепторов стероидных гормонов. Максимальный синтез Hsp70 в клетках наблюдается через 7-8 ч после окончания теплового шока и поддерживается на высоком уровне еще 4-5 ч. Через 24 ч после шока синтез Hsp70 значительно уменьша-

ется. Напротив, для общего синтеза клеточных белков характерна значительная депрессия во время шока и в первые часы после него. Синтез основных клеточных белков начинает усиливаться через 7-8 ч и достигает нормальных значений только через 24 ч после окончания шока. В связи с этим, на определенном этапе после шока Hsp70 может составлять 15-20% от всех белков цитоплазмы. Кроме того, после стресса Hsp70 может накапливаться в наиболее «уязвимых» участках клетки, а именно: в первые 4-5 ч – в ядре, затем в перинуклеарной, присарколеммальной зонах и вдоль актиновых филаментов. Смысл накопления Hsp70 в ядре после повреждения клетки заключается в защите генетического материала. Таким образом, Hsp70 играет значительную роль в повышении устойчивости клеточного аппарата биосинтеза белка к повреждающим воздействиям.

Кроме того, имеются данные о связи Hsp70 с вновь синтезированными тяжелыми цепями Ig в тех областях, где может происходить как нормальное связывание с легкой цепью, так и нежелательное связывание тяжелых цепей друг с другом, т.е. его присутствие препятствует образованию агрегатов из тяжелых цепей. Затем в ходе АТФ-азной реакции легкая цепь вытесняет белок теплового шока и формируется нормальная структура Ig. Накопление Hsp70 после кратковременных воздействий на клетку тепловым шоком лежит в основе феномена временного повышения порога температурной чувствительности клеток, так называемой термотолерантности.

Физиологическая роль Hsp70 изучалась на множестве моделей при таких условиях, как гипертермия, гипертензия, контакт с токсичными химическими веществами, гипоксия, ишемия, воспаление, аутоиммунные патологии, апоптоз, злокачественные опухоли, трансплантация органов, бактериальные и вирусные инфекции. Уровень Hsp70 также исследовали при нормальных процессах старения, сперматогенеза, в зависимости от фазы менструального цикла и физической нагрузки. Рядом исследователей отмечено, что при аутоиммунных заболеваниях, таких как СКВ, РА, повышение содержания Hsp70 в лимфоцитах крови связано с активностью патологического процесса. При повторяющихся эпизодах ишемии/реперфузии также была обнаружена активация синтеза Hsp70. Было показано, что кратковременные эпизоды окклюзий коронарных артерий с интервалами реперфузии существенно повышали толерантность миокарда к последующим, более длительным ее эпизодам, что приводило к снижению частоты развития инфаркта миокарда, снижению риска жизнеугрожающих аритмий. Белки теплового шока в этой ситуации выступают не только как шапероны, но и как потенциальные антиоксиданты. Таким образом, обнаруженная связь между содержанием Hsp70 в клетках и устойчивостью тканей к ишемии и реперфузии,

участие Hsp70 в формировании термотолерантности и явления перекрестной толерантности к разным повреждающим агентам служат проявлением их ярко выраженных цитопротекторных свойств. Вместе с тем, Hsp необходимы для нормальной жизнедеятельности клетки, т.к. участвуют в поддержании клеточного гомеостаза, процессах роста и дифференцировки клеток.

Можно выделить следующие основные положения о физиологической роли Hsp70:

- В клетке после стресса быстрыми темпами происходит накопление Hsp70, предшествующее восстановлению синтеза других клеточных белков.
- В ранний постстрессорный период Hsp70 локализуется в основном в ядре, в поздний – в 3 областях цитоплазмы: присарколеммальной, перинуклеарной и вдоль актиновых филаментов.
- В клетке, подвергшейся стрессорному воздействию, Hsp70 мгновенно нормализуют формирование рибосом, предупреждая агрегационные процессы при фолдинге белков и восстанавливая нормальную структуру миофибриллярного аппарата.
- В постстрессорный период Hsp70 является составной частью клеточной системы репарации, защищая процессы биосинтеза белка и структурную целостность клеточных пептидов.

Белок теплового шока – Hsp70B'

Hsp70B' человека – это основной вариант Hsp70, являющийся продуктом отдельного гена, который лишен интронов. Последовательность гена Hsp70B' на 77% идентична гену Hsp70 (идентичность по кДНК – 70%). В отличие от Hsp70, для которого показан базовый уровень экспрессии и индукция при нагревании и других воздействиях, Hsp70B' строго индуцируется только нагревом и не экспрессируется конституционно. В одном из исследований было показано использование Hsp70B' как гена-мишени для изучения однонуклеотидных позиций в геномной ДНК (SNP) в биоптатах человеческой опухоли предстательной железы. Однако использование белка Hsp70B' при исследовании белков теплового шока только начинает развиваться.

Белок теплового шока Hsp90α

Семейство белков Hsp90 очень консервативно и выявляется у всех видов. В норме Hsp90 может составлять 1-2% от всех белков клетки, но этот уровень увеличивается при тепловом шоке или при воздействии других стресс-факторов на клетку. В условиях теплового шока высокий уровень Hsp90 необходим для эффективной реактивации денатурированных нагреванием белков, тогда как при нормальных условиях Hsp90 требуется отдельным группам субстратных протеинов. Hsp90 млекопитающих обычно существует в виде димеров и во многом функционально подобен Hsp70. Другие шапероны часто обнаруживаются в Hsp90-комплексах в цитоплазме и образуют интегральную часть повсеместной многокомпонентной системы шаперонов. Hsp90 участвует во многих путях передачи сигнала, включая рецепторы глюкокортикоидов и прогестерона, эстрогена, диоксина и протеинкиназ. Детальный анализ экспрессии подтверждает, что Hsp90α играет специфическую роль в нормальном процессе митоза, дополнительно защищая клетки эмбриона от неблагоприятных факторов окружающей среды. Различные профили экспрессии изоформ Hsp90 дополнительно подчеркивают их функциональную значимость во время онтогенеза и стресса у животных.

Новые исследования предприняты для изучения внеклеточной роли Hsp90α. Известно, что Hsp90α действует как шаперон матриксной металлопротеиназы-2 (MMP2)* в клетках HT-1080 фибросаркомы, приводя к повышению инвазивности опухоли. В недавних клинических исследованиях Hsp90-комплекс шаперонов был использован как молекулярная мишень при раке пищевода человека. Во многих исследованиях было показано, что шапероны облегчают злокачественную трансформацию на молекулярном уровне, и Hsp90 предложен в качестве новой мишени для противоопухолевой терапии. Для изучения роли Hsp90 в развитии детских опухолей был использован гелданамицин, ингибитор Hsp90. В преclinical исследованиях на моделях рака молочной железы были использованы ингибиторы Hsp90 в комбинации с общепринятыми методами химиотерапии для подтверждения роли Hsp90 как онкогенной мишени при этом заболевании.

* Матриксные металлопротеиназы – см. раздел «Матриксные металлопротеиназы», стр. 445

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА



Кат.№	Производитель	Наименование
488-5000	BCM Diagnostics	Белок теплового шока Hsp27, 96
488-6000	BCM Diagnostics	Белок теплового шока Hsp60, 96
488-7000	BCM Diagnostics	Белок теплового шока Hsp70, 96
488-7250	BCM Diagnostics	Белок теплового шока Hsp70B prime, 96
488-8950	BCM Diagnostics	Белок теплового шока Hsp90 альфа, 96
900-650	BCM Diagnostics	Антитела к белку теплового шока Hsp60, 96
900-750	BCM Diagnostics	Антитела к белку теплового шока Hsp70 (IgG/IgM), 96