

CEZARY BREGIER, HANNA FABCZAK, STANISŁAW FABCZAK

*Zakład Biologii Komórki
Instytut Biologii Doświadczalnej PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa
E-mail: c.bregier@nencki.gov.pl
h.fabczak@nencki.gov.pl
s.fabczak@nencki.gov.pl*

BIAŁKA OPIEKUŃCZE – „MOLEKULARNE PRYZWOITKI” W FAŁDOWANIU BIAŁEK

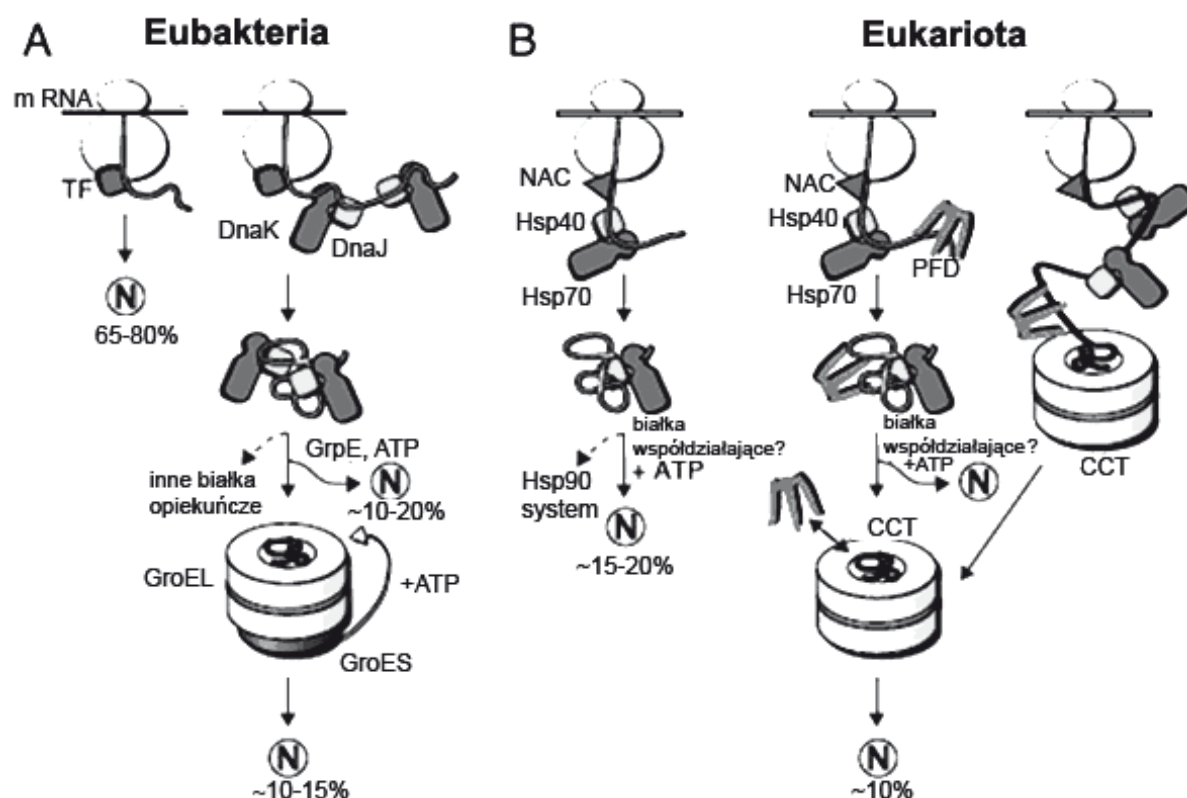
WPROWADZENIE

Białka, aby mogły pełnić swoją funkcję w komórce, nie tylko muszą posiadać właściwą sekwencję aminokwasową, ale niezwykle ważna jest ich prawidłowa i specyficzna struktura trzeciorzędowa, którą uzyskują w procesie fałdowania. Tworzący się polipeptyd może teoretycznie przyjmować wiele różnych konformacji, ale tylko jedna z nich odpowiada natywnej formie i jest wystarczająco stabilna oraz biologicznie aktywna w warunkach fizjologicznych. Sekwencja aminokwasów nie określa jednoznacznie trójwymiarowej struktury białka, jednak w przypadku prostych, krótkich polipeptydów stanowi wystarczającą informację umożliwiającą im osiągnięcie stanu natywnego. Większe białka o wielodomowej strukturze nie są w stanie spontanicznie osiągnąć właściwej konformacji. Częściowo zwinięte łańcuchy polipeptydów osiągają stan pośredni, często charakteryzujący się ekspozycją na zewnątrz obszarów hydrofobowych, co sprzyja skupianiu się nieprawidłowo sfaldowanych białek w agregaty (ELLIS i HARTL 1996). Podobny efekt może być wywołany działaniem na komórkę czynników stresowych (wysoka temperatura, etanol, metale ciężkie, czynniki uszkadzające DNA, zmiany pH środowiska), które powodują naruszenie natywnej struktury białka. Nowo syntetyzowane polipeptydy oraz uszkodzone białka, aby osiągnąć prawidłową konformację, wyma-

gają udziału wyspecjalizowanych narzędzi, którymi są białka opiekuńcze, „molekularne przyzwoitki” (ang. molecular chaperones). Należy jednak podkreślić, że termin białka opiekuńcze określa dużą, zróżnicowaną, niespokrewnioną ze sobą grupę białek, których funkcja w komórce nie ogranicza się jedynie do towarzyszenia nowo syntetyzowanym polipeptydom w trakcie fałdowania. Białka opiekuńcze, wiążąc się przejściowo z innymi białkami, pomagają także w utrzymaniu ich natywnej konformacji (np. zabezpieczeniu przed denaturacją termiczną), uczestniczą w ich degradacji oraz transporcie (ELLIS 1997).

W tym artykule naszą uwagę skupiliśmy właśnie na grupie białek opiekuńczych, które ułatwiają prawidłowe zwijanie białek *in vivo* i zapobiegają tworzeniu agregatów z nieprawidłowo sfaldowanych polipeptydów. Formowanie agregatów białkowych jest stanem patologicznym i stanowi przyczynę wielu chorób „konformacyjnych” (choroby: Alzheimer, prionowa i Parkinsona, cukrzyca typu II, płasowica Huntingtona) (BARRAL i współaut. 2004, SPIESS i współaut. 2004, LEE i TSAI 2005).

Zwijanie białek jest procesem skomplikowanym i nie w pełni poznanym. Zarówno u Prokariota, jak i u Eukariota przebiega on wieloetapowo i angażuje, oprócz białek opiekuńczych, wiele współdziałających z nimi czynników (Ryc. 1).

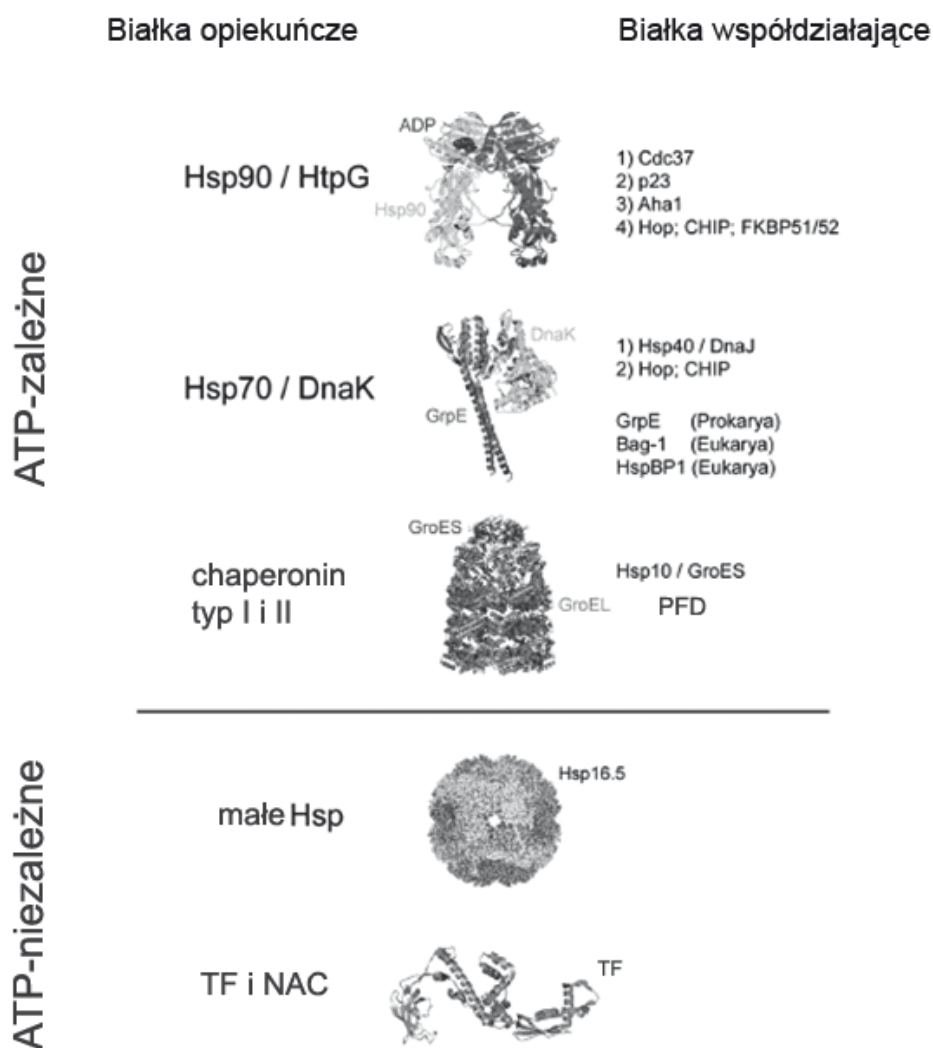


Ryc. 1. Schemat przedstawiający drogi fałdowania nowo syntetyzowanych polipeptydów przez białka opiekuńcze (rybosomowe i cytoplazmatyczne) u Eubakterii (A) i Eukariota (B) (wg HARTLA i HAYER-HARTL 2002, zmodyfikowana).

BIAŁKA OPIEKUŃCZE – ASYSTA PODCZAS FAŁDOWANIA POLIPEPTYDÓW

Białka opiekuńcze uczestniczące w procesie zwijania białek zostały zidentyfikowane u wszystkich gatunkach i we wszystkich królestwach istot żywych. Ich wspólną cechą jest zdolność do rozpoznawania reszt hydrofobowych, które są najczęściej ekspozowane przez białka niewłaściwie sfalutowane. W oparciu o lokalizację komórkową białka opiekuńcze mogą być podzielone na 2 grupy. Jedną z nich stanowią białka opiekuńcze rozpuszczone w cytoplazmie, które wiążą się posttranslacyjnie do nowopowstałych lub mających nieprawidłową konformację białek. Do drugiej grupy można zaliczyć związane z rybosomami białka opiekuńcze odpowiedzialne za fałdowanie kotranslacyjne, czyli takie, które już podczas translacji oddziałują z syntetyzowanym łańcuchem polipeptydowym. Przedstawicielami grupy pierwszej są białka opiekuńcze CCT w komórkach eukariotycznych (ang. chaperonin type II) i GroEL u bakterii (ang. chaperonin type I), zbudowane z wielu podjednostek, oraz białka z rodziny Hsp 90 i Hsp70,

wspomagane przez białka z grupy J/Hsp40. Homologami tych ostatnich u bakterii są DnaK i DnaJ. Natomiast, do białek opiekuńczych związanych z rybosomami, w komórkach eukariotycznych zalicza się NAC (ang. nascent chain-associated complex), RAC i Ssb. U bakterii homologiem funkcjonalnym NAC jest czynnik inicjujący TF (ang. trigger factor). Poza różną lokalizacją białek opiekuńczych w komórce, drugim ważnym kryterium ich podziału jest udział ATP podczas zwijania łańcucha polipeptydowego. Proces fałdowania może odbywać się bądź na drodze aktywnej, zależnej od ATP, tak jak ma to miejsce w przypadku cytoplazmatycznych białek opiekuńczych, oraz RAC i Ssb, lub w sposób pasywny bez udziału energii, charakterystyczny dla pozostałych białek opiekuńczych związanych z rybosomami (TF i NAC). Na Ryc. 2 zestawiono najważniejsze białka opiekuńcze wraz z białkami współdziałającymi z nimi, które zaangażowane są w proces fałdowania białek (BUKAU i współaut. 2006)



Ryc. 2. Zestawienie ważniejszych białek opiekuńczych zależnych i niezależnych od ATP wraz z ich białkami współdziałającymi (wg LEE i TSAI 2005, zmodyfikowana).

BIAŁKA OPIEKUŃCZE ZWIĄZANE Z RYBOSOMAMI

Białka syntetyzowane są w komórce przez rybosomy w sposób ukierunkowany, czyli od końca aminowego do karboksylowego. Tak więc, N-koniec polipeptydu jest już umiejscowiony w tunelu rybosomu, w czasie kiedy C-koniec jest nadal syntetyzowany. Nie wiele wiadomo o konformacji powstającego polipeptydu w tunelu rybosomu. Co prawda, średnica tunelu rybosomu może pozwolić na przybranie przez polipeptyd struktury helikalnej, jednak mało prawdopodobne wydaje się, by białka mogły osiągnąć w tym momencie złożoną konformację przestrzenną. Niektóre fakty świadczą o tym, że fałdowanie nowo syntetyzowanych białek jest inicjowane ko-translacyjnie w momencie odłączania się ich

od rybosomu (WĘGRZYN i DEURLING 2005). Następuje wówczas połączenie polipeptydu z białkami opiekuńczymi związanymi z rybosomem. Pozwala to skierować białka na właściwy szlak fałdowania, co jest niezwykle ważnym etapem w tym procesie. Chociaż system białek opiekuńczych związanych z rybosomami występuje zarówno w komórkach eukariotycznych, jak i prokariotycznych, to oprócz funkcjonalnego podobieństwa tych dwóch systemów nie stwierdzono między nimi zbieżności ani w sekwencji aminokwasowej, ani w ich strukturze przestrzennej (WĘGRZYN i DEURLING 2005). Wszystkie białka opiekuńcze (w obrębie tej grupy) wiążą się do dużej podjednostki rybosomu w stosun-

ku stechiometrycznym 1:1 i mogą łączyć się z olbrzymią liczbą różnorodnych substratów. Obecność lub brak nowo syntetyzowanego łańcucha polipeptydowego zmienia powinowactwo białka opiekuńczego do rybosomu (WĘGRZYN i DEURLING 2005).

BIĄŁKO OPIEKUŃCZE ZWIĄZANE Z RYBOSOMAMI U BAKTERII – CZYNNIK INICJUJĄCY TF

W komórkach prokariotycznych białkiem opiekuńczym związanym z rybosomami jest czynnik inicjujący TF. Białko to ma masę cząsteczkową 48 kDa i można w nim wyróżnić 3 domeny. Przy N-końcu (1–148 reszt aminokwasowych) występuje domena umożliwiająca przyłączenie TF do rybosomu. Kluczym motywem odpowiedzialnym za to połączenie jest wysoko konserwowany fragment GFRXGXXP, nazywany „sygnaturą TF” (ang. signature TF), w obrębie którego mutacja powoduje nie tylko wadliwe połączenie białka opiekuńczego z rybosomem, ale również wpływa na interakcję z nowo syntetyzowanym polipeptydem. TF łączy się z L23, jednym z białek zachowanych w ewolucji, wchodzącym w skład rybosomu, które zlokalizowane jest w miejscu uwalniania polipeptydu (WĘGRZYN i DEURLING 2005). Druga domena TF (149–245 reszt aminokwasowych) posiada aktywność *cis/trans* izomerazy peptydylo-prolilowej (PPI-azy) i jest homologiczna do PPI-azy typu FKPB (ang. FK506 binding protein). Rozpoznawanie peptydów przez TF jest jednak niezależne od reszt prolinowych, a wiązanie białka opiekuńczego następuje do krótkich sekwencji bogatych w reszty aminokwasów niepolarnych. Funkcja tej domeny nie jest poznana, gdyż mutacja w jej obrębie, powodująca zmniejszenie aktywności PPI-azy lub też całkowite usunięcie tej domeny, nie ma wpływu na funkcjonowanie TF jako białka opiekuńczego (GENEVAUX i współaut. 2004; KRAMER i współaut. 2004a, b). Przy C-końcu (246–436 reszt aminokwasowych) zlokalizowana jest trzecia domena stanowiąca połowę cząsteczki TF i nie posiadająca homologii do żadnego innego białka. Usunięcie tej domeny skutkuje utratą aktywności zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* (GENEVAUX i współaut. 2004).

Badania krystalograficzne pozwoliły ustalić strukturę przestrzenną tego białka. Domena wiążąca TF do rybosomu tworzy ogon cząsteczki, podczas gdy drugi fragment, połączony z nią łącznikiem o długości 70 Å, posiadający aktywność PPI-azy, stanowi jej głowę. Domena karboksylowa mająca w struk-

turze trzeciorzędowej konformację α -helisy, umieszczona jest między pierwszą a drugą domeną. Dzięki takiej budowie, pomiędzy domenami przy N- i C-końcach TF, tworzy się duża kieszeń, strukturalnie przypominająca kołyskę ekspozuje wiele hydrofobowych rejonów, która udostępniając w ten sposób miejsca kontaktu dla nowo syntetyzowanego, niesfałdowanego polipeptydu (FERBITZ i współaut. 2004, WĘGRZYN i DEURLING 2005).

Co dzieje się z łańcuchem polipeptydowym związanym przez TF? Istnieją dwa alternatywne modele, które nie wykluczają się wzajemnie i mogą wyjaśniać ten problem w zależności od typu substratu syntetyzowanego przez rybosom. Pierwszy z nich zakłada, że polipeptyd pozostaje związany z podobną do kołyski strukturą TF, co pozwala na sfałdowanie nowo syntetyzowanych domen. W drugim modelu funkcja TF ogranicza się jedynie do ochrony nowo powstałego polipeptydu przed zbędną interakcją lub degradacją. Za pierwszym modelem przemawiają dane uzyskane w badaniach krystalograficznych, z których wynika, że w strukturze podobnej do kołyski może pomieścić się białko lub domena, której wielkość wynosi około 15 kDa. Średnia wielkość domen waha się od 100 do 130 reszt aminokwasowych, co odpowiada 11–14 kDa. Wydaje się zatem, że TF, a raczej rozmiar domeny przypominającej kołyskę, spełnia warunki wymagane do fałdowania białek posiadających wiele dużych domen. Przypuszczenia te są poparte obserwacjami, w których stwierdzono, że izolowana domena podobna do kołyski odpowiada cząsteczce TF pozbawionej domeny PPI-azy i zachowuje większość miejsc wiązania substrat-TF oraz wykazuje prawie taką samą aktywność jak dzika forma TF (GENEVAUX i współaut. 2004, KRAMER i współaut. 2004a, WĘGRZYN i DEURLING 2005).

W obu modelach TF może oddziaływać z substratem poprzez wiele przejściowych kontaktów o charakterze hydrofobowym, wykazujących niskie powinowactwo. Taki typ oddziaływań może zapewnić ochronę nowo syntetyzowanego łańcucha polipeptydowego i umożliwić jego fałdowanie. Nie jest jasne w jaki sposób następuje zerwanie połączenia substrat-TF. Prawdopodobnie tak szybko, jak tylko polipeptyd osiągnie właściwą strukturę trzeciorzędową, hydrofobowe oddziaływania pomiędzy TF a polipeptydem zanikają i sfałdowana domena może zostać odłączona od białka opiekuńczego. Z drugiej strony, sam proces zwijania białka może wytwarzać siły

mechaniczne, które powodują zrywanie wiązań pomiędzy TF a substratem. W obu wypadkach odłączenie białka od TF następuje bez udziału ATP (HARTL i HAYER-HARTL 2002, WĘGRZYN i DEUERLING 2005).

SYSTEM BIAŁEK OPIEKUŃCZYCH ZWIĄZANYCH Z RYBOSOMAMI W KOMÓRKACH EUKARIOTYCZNYCH

Wśród Eukariota, białka opiekuńcze związane z rybosomami zostały najlepiej poznane u *Saccharomyces cerevisiae*. W komórkach drożdży scharakteryzowano dwa systemy białek opiekuńczych związanych z rybosomami, biorących udział w kotranslacyjnym fałdowaniu białek: Ssb/Ssz/Zuo-triada oraz kompleks NAC (WĘGRZYN i DEURLING 2005). Pierwsza grupa oparta jest na systemie Hsp70/Hsp40. W jej skład wchodzi dwa białka, Hsp70 Ssb/Ssz i białko Hsp40 (Zuo), będące ko-faktorem dla Ssz. Ssz i Zuo tworzą związek z rybosomem kompleks RAC (ang. ribosome-associated complex), który wraz z Ssb formuje triadę (GAUTSCHI i współaut. 2002). Rola tych białek podczas kotranslacyjnego fałdowania polipeptydów nie jest w pełni poznana. Wydaje się, że RAC i Ssb biorą raczej udział w fałdowaniu nowo syntetyzowanych polipeptydów, gdyż nie zaobserwowano zmiany ich ekspresji po poddaniu komórki działaniu warunków stresowych. Należy nadmienić, że występowanie tego systemu jest ograniczone tylko do drożdży. W innych komórkach eukariotycznych nie zidentyfikowano go, chociaż niektóre jego elementy zostały poznane u ssaków (HUNDLEY i współaut. 2005, OTTO i współaut. 2005).

Drugi system związany z rybosomami, heterodimeryczny kompleks NAC, zbudowany z podjednostek α (33 kDa) (α NAC) i β (22 kDa) (β NAC), jest ewolucyjnie zachowany i został zidentyfikowany zarówno w drożdżach, jak i w komórkach ssaków (ROSPERT i współaut. 2002). NAC został znaleziony także u Archea, jednak występuje on w tych organizmach w

prostszej formie. Brak jest podjednostki β , a kompleks będący homodimerem utworzony jest z dwóch α -cząsteczek (α eNAC). NAC łączy się do białka L 25, które, podobnie jak L 23, zlokalizowane jest u wylotu tunelu rybosomu. W wiązaniu do niego NAC bierze udział wyłącznie β -podjednostka. Usunięcie z niej fragmentu 11 reszt aminokwasowych przy N-końcu skutkuje niezdolnością wiązania się kompleksu do rybosomu i zmianą jego lokalizacji w komórce (FRANKE i współaut. 2001, GRALLATH i współaut. 2006). Miejsca wiązania substratu do NAC występują na obu podjednostkach (WĘGRZYN i DEURLING 2005).

Ze względu na brak danych krystalograficznych dotyczących struktury NAC w komórkach eukariotycznych, o budowie tego białka można wnioskować tylko na podstawie wyników badań uzyskanych dla α eNAC u Archea. W cząsteczce tego białka wyodrębnione są dwie domeny, NAC i UBA (ang. ubiquitin-associated). Domena NAC odpowiada za dimeryzację kompleksu α NAC i należy przypuszczać, że podobną funkcję może ona pełnić przy tworzeniu heterodimeru NAC w komórkach eukariotycznych (SPRETER i współaut. 2005). Domena UBA została zidentyfikowana również w α NAC występującym w komórkach eukariotycznych, brak jest jej natomiast w β NAC. Rola tej domeny w białku opiekuńczym jest intrygująca, gdyż początkowo została ona scharakteryzowana w ligazie ubikwityny i w innych białkach biorących udział w szlaku degradacji białek w proteasomach. Jaką zatem funkcję może pełnić ta domena w NAC? Możliwe, że związane z NAC, nieprawidłowo sfałdowane białka mogą być degradowane w proteasomach (WĘGRZYN i DEURLING 2005). Ponieważ opisano także kotranslacyjną ubikwitynację nowo syntetyzowanych polipeptydów nie można wykluczyć udziału domeny UBA w tym procesie (TURNER i VARSHAVSKY 2000). Sugeruje się również jej udział w dimeryzacji kompleksu NAC (BUCHBERGER 2002).

CYTOPLAZMATYCZNE BIAŁKA OPIEKUŃCZE

Chociaż mechanizm kotranslacyjnego fałdowania polipeptydów z udziałem białek opiekuńczych związanych z rybosomami nie jest w pełni poznany, wiadomo jednak, że rybosomy opuszcza bardzo wiele polipeptydów w różnym stopniu sfałdowania i mogą one wykorzystywać odmienne szlaki, mające na celu nadanie im prawidłowej konforma-

cji. Małe białka o prostej strukturze nie wymagają dodatkowej opieki, aby osiągnąć właściwą strukturę trzeciorzędową. Dla dużych, wielodomenowych polipeptydów, których proces zwijania przebiega wolniej, wymagana jest obecność aktywnych cytoplazmatycznych białek opiekuńczych fałdujących polipeptydy z wykorzystaniem do tego celu

ATP. Do tej grupy należą niektóre białka szoku cieplnego Hsp (ang. heat shock proteins). Charakteryzują się one zachowaną w ewolucji strukturą pierwszorzędową (LINDQUIST i CRAIG 1988). Ekspresja tych białek w komórce wzrasta po zadziałaniu czynników stresowych. Ich funkcja wiąże się nie tylko z kontrolą prawidłowego fałdowania powstających polipeptydów, ale także w transporcie białek przez błony lub ich ponownym fałdowaniem i rozfałdowywaniem. Ta uniwersalność funkcji osiągnięta jest dzięki powieleniu i różnicowaniu w toku ewolucji genów *hsp70*, w wyniku czego powstały wyspecjalizowane białka opiekuńcze Hsp70 oraz bardziej odmienne białka Hsp110 i Hsp170. Wielostronność funkcji osiągnięta została również poprzez kooperację z wieloma białkami towarzyszącymi, takimi jak białka J/Hsp40 lub tzw. czynnikami wymiany nukleotydów, NEF (ang. nucleotide exchange factors) (BUKAU i współaut. 2006, QIU i współaut. 2006, ZIETKIEWICZ i współaut. 2006).

SYSTEM DnaK/DnaJ U *ESCHERICHIA COLI*

Łańcuchy polipeptydowe, będące w stanie przejściowym i nie posiadające prawidłowej konformacji, w przypadku bakterii fałdowane są przy udziale systemu białek opiekuńczych, w skład których wchodzi, homologiczne do Hsp70, białka DnaK i DnaJ (KEDZIERSKA i współaut. 1999, BUKAU i współaut. 2006, QIU i współaut. 2006]. Część DnaK można podzielić na dwie główne domeny. Przy jej końcu aminowym występuje około 44 kDa domena ATP-azowa, zaś na końcu karboksylowym 27 kDa domena wiążąca polipeptydy. Tę z kolei można podzielić na kilka poddomen, β -segment z kieszenią wiążącą polipeptyd i α -helisę. DnaK występuje w dwóch stanach funkcjonalnych, zależnych od stopnia ufosforylowania związanego z nim nukleotydu. Gdy DnaK połączone jest z ATP, występuje w stanie niskiego powinowactwa do substratu (T), który charakteryzuje się szybkim wiązaniem i uwalnianiem polipeptydu. Kiedy z DnaK pozostaje związane ADP, obserwuje się stan wysokiego powinowactwa do substratu (R), cechujący się powolnym wiązaniem i odłączaniem fałdowanego białka. W konwersji ze stanu T do R pośredniczy białko DnaJ wraz ze związanym substratem, gdyż oba te białka stymulują ATP-azową aktywność DnaK. Proces odwrotny, czyli przejście ze stanu R do T, kontrolowany jest przez białko GrpE, które przyspiesza wymianę ADP związanego z DnaK na

ATP. Połączenie substratu z DnaK następuje tylko po związaniu przez białko opiekuńcze ATP, co ułatwia współdziałające z nim białko DnaJ (40 kDa). W DnaJ można wyróżnić 4 domeny. Wysoce zachowanym w ewolucji motywem jest domena J, odpowiedzialna za stymulację aktywności ATP-azowej DnaK. Następne w kolejności, to domena bogata w reszty glicyny i fenyloalaniny (G/F), domena bogata w reszty cysteinowe wiążąca jony cynku i domena karboksylowa. Koniec karboksylowy DnaJ działa podobnie jak białko opiekuńcze, gdyż rozpoznaje hydrofobowe fragmenty substratu, co ułatwia jego wiązanie po uwolnieniu z rybosomu. Po związaniu substratu, DnaJ transportuje go do DnaK, który łączy się z polipeptydem poprzez oddziaływanie hydrofobowe i wiązania wodorowe. Podobnie jak TF, DnaK wiąże się do krótkich fragmentów polipeptydu (około 7 reszt aminokwasowych), w centrum których zlokalizowany jest aminokwas niepolarny (preferowane są leucyna i izoleucyna). Statystycznie miejsce wiązania występuje co 40 reszt aminokwasowych.

DnaJ, wraz z przyłączonym substratem, stymuluje hydrolizę ATP związanego z DnaK, co ułatwia osiągnięcie stanu wysokiego powinowactwa DnaK-ADP, dzięki czemu powstaje stabilny kompleks ADP-DnaK-substrat. Polipeptyd pozostaje związany z DnaK do momentu przyłączenia się białka GrpE. Następuje wówczas destabilizacja układu i odłączenie ADP. Najczęściej proces fałdowania nie kończy się na jednym cyklu i białka, aby osiągnąć prawidłową konformację przestrzenną, muszą być poddane kilku cyklom zwijania z udziałem DnaK i białek współdziałających lub przekazane do innego systemu białek opiekuńczych celem ukończenia procesu zwijania (WALL i współaut. 1995, HOURS 2001, HARTL i HAYER-HARTL 2002, QIU i współaut. 2006).

BIAŁKA OPIEKUŃCZE Hsp70 ORAZ Hsp90

U Eukariota, podobnie jak w bakteriach, niekompletnie sfałdowane lub rozfałdowane białko, na skutek działania warunków stresowych, do osiągnięcia natywnej konformacji wymaga udziału dodatkowego systemu białek opiekuńczych. Są nimi białka z rodziny Hsp 70 wraz z współdziałającymi z nimi białkami J/Hsp40, będącymi układem funkcjonalnie homologicznym do bakteryjnych DnaK i DnaJ. Podobnie jak w systemie DnaK/DnaJ, fałdowanie polipeptydów odbywa się kosztem ATP, a białkami odpowiedzialnymi za

wymianę nukleotydów są białka z grupy BAG (BUKAU i współaut. 2006).

Mechanizm funkcjonowania systemu białek opiekuńczych Hsp90, który stanowi kolejny etap procesu fałdowania białek w komórkach eukariotycznych, jest tylko częściowo wyjaśniony. Białka z tej rodziny mogą odmiennie funkcjonować w przypadku polipeptydów syntetyzowanych *de novo* oraz rozfałdowanych w wyniku działania czynników stresowych. W warunkach fizjologicznych substratami Hsp90 są receptory hormonów steroidowych, kinazy protoonkogenów (Raf i Src) i regulatory cyklu komórkowego

(Cdk4). Homodimer Hsp90 rozpoznaje swoje substraty w częściowo sfałdowanej postaci przejmując je od Hsp70 za pośrednictwem białka p60/Hop (ang. Hsp-organizing protein). Podobnie jak ma to miejsce w systemie Hsp70, w przypadku Hsp90 zwijanie białka odbywa się również w kilku cyklach, czemu towarzyszy hydroliza ATP. W warunkach stresowych Hsp90 wiąże się z białkami mniej selektywnie i przejmuje raczej funkcje przechowujące niesfałdowane białka, które mogą stopniowo być fałdowane przez inne białka opiekuńcze (MAYER i BUKAU 1999, BARRAL i współaut. 2004).

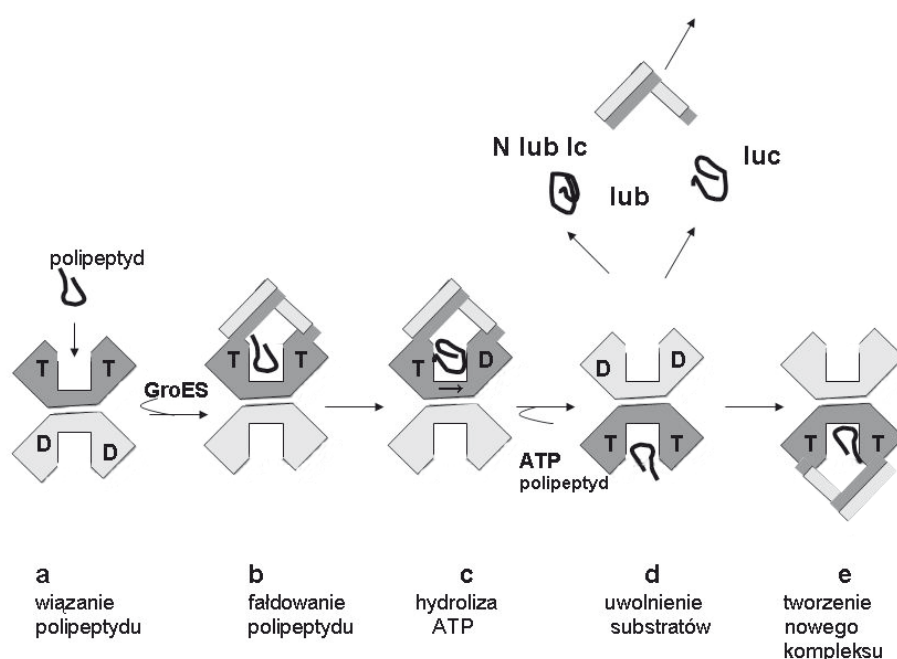
BIĄŁKA OPIEKUŃCZE GroEL I CCT, STRUKTURA I FUNKCJA

Wśród białek opiekuńczych, wykorzystujących ATP do procesu zwijania polipeptydów, wydzielona została odrębna rodzina, w skład której wchodzi białka opiekuńcze GroEL u bakterii (chaperoniny I) oraz CCT w komórkach eukariotycznych (chaperoniny II) (SPIESS i współaut. 2004, BREGIER i współaut. 2008). Mogą one, tak jak w przypadku tubuliny lub aktyny, przejmować nowo syntetyzowane łańcuchy polipeptydowe bezpośrednio z rybosomu przy współdziałaniu prefoldyny (PFD). Często są one jednak kolejnym ogniwem w procesie zwijania białek i przejmują, poprzez interakcję z białkiem p60/Hop, nie w pełni sfałdowany substrat oddysocjowany od Hsp70 (BARRAL i współaut. 2004).

Białka opiekuńcze CCT i GroEL, olbrzymie kompleksy o budowie pierścieniowej, których masa cząsteczkowa osiąga około 900 kDa, są również ewolucyjnie zachowaną grupą białek i zostały zidentyfikowane we wszystkich królestwach świata ożywionego, od Prokariota poprzez Archaea do Eukariota. Podzielono je na dwie podstawowe grupy. Grupa pierwsza to białka opiekuńcze GroEL /Hsp60, charakterystyczne dla Prokariota, występujące również w organellach komórek eukariotycznych, mitochondriach i chloroplastach. Druga grupa obejmuje białka obecne w Archaea (termosomy) oraz chaperoniny CCT (ang. chaperonin-containing TCP-1) występujące w cytoplazmie komórek eukariotycznych, znane także pod nazwami TriC lub c-cpn. Stopień identyczności pomiędzy CCT i GroEL wynosi zaledwie 15–20%, co sugeruje bardzo wczesne oddzielenie się ich w procesie ewolucji, które mogło nastąpić około dwa miliardy lat temu (GUTSCHE i współaut. 1999, COWAN i LEWIS 2001, HORWICH i współaut. 2007).

BIĄŁKA OPIEKUŃCZE GroEL

Białka opiekuńcze GroEL wymagają do swojego funkcjonowania białka współdziałającego GroES. GroEL zbudowana jest z dwóch pierścieni ułożonych przeciwstawnie, a każdy z nich składa się z 7 podjednostek. Badania przy użyciu promieniowania X wykazały, że każdy monomer tworzą trzy domeny: bazalna, apikalna oraz łącząca je domena środkowa. Część bazalna, która posiada miejsce wiązania ATP, odpowiedzialna jest za interakcje pomiędzy monomerami zarówno w obrębie jednego pierścienia, jak również pomiędzy nimi. Domena apikalna stanowi zaś miejsce wiązania niesfałdowanego polipeptydu i GroES-małego heptameru, który wskutek niewielkich zmian allosterycznych, wywołanych przyłączeniem cząsteczki ATP do domeny bazalnej GroEL, wiąże się z częścią apikalną białka opiekuńczego, pełniąc funkcję pokrywy zamykającej substrat w obrębie kanału. GroEL wiąże 7 cząsteczek ATP do podjednostek jednego pierścienia. W tym samym czasie miejsca wiązania nukleotydów na drugim pierścieniu pozostają wolne, co wskazuje, że oba pierścienie GroEL działają naprzemiennie. Cząsteczka ATP przyłączana jest najprawdopodobniej do GroEL, występującej w konformacji otwartej. Związanie się białka współdziałającego GroES z GroEL prowadzi do zamknięcia polipeptydu w jej wnętrzu. Wydaje się, że interakcja GroEL z niesfałdowanym polipeptydem jest niespecyficzna i występuje pomiędzy powierzchnią hydrofobową domeny apikalnej GroEL a dowolnymi regionami hydrofobowymi eksponowanymi przez polipeptyd (FENTON i współaut., 1994, BUCKLE i współaut., 1997, FARR i współaut. 2000, LEVY-RIMLER i współaut. 2002, HORWICH



Ryc. 3. Model zależnego od ATP cyklu fałdowania polipeptydu przez kompleks GroEL/GroES.

Literą T oznaczono ATP, D-ADP, N-polipeptyd w natywnej formie, I_c – stan przejściowy polipeptydu przeznaczanego do dalszego fałdowania w celu osiągnięcia stanu natywnego, I_{uc} – polipeptyd w stanie przejściowym – forma niestabilna. (a) cząsteczka ATP przyłączana jest najprawdopodobniej do GroEL, gdy ta występuje w konformacji otwartej, przed związaniem polipeptydu; (b) asocjacja do kompleksu białka współdziałającego GroES prowadzi do zamknięcia polipeptydu wewnątrz tunelu białka opiekuńczego; (c) kolejnym etapem jest hydroliza ATP w pierścieniu; (d) uwolnienie z jego wnętrza substratów i przyłączenie ATP do pierścienia przeciwnego. W tym samym czasie GroES łączy się z przeciwnym pierścieniem i tworzy się nowy kompleks (wg GRANTCHARTOVEJ i współaut. 2001, zmodyfikowana).

i współaut. 2007). Uproszczony schemat funkcjonowania GroEL/GroES przedstawiono na Ryc. 3.

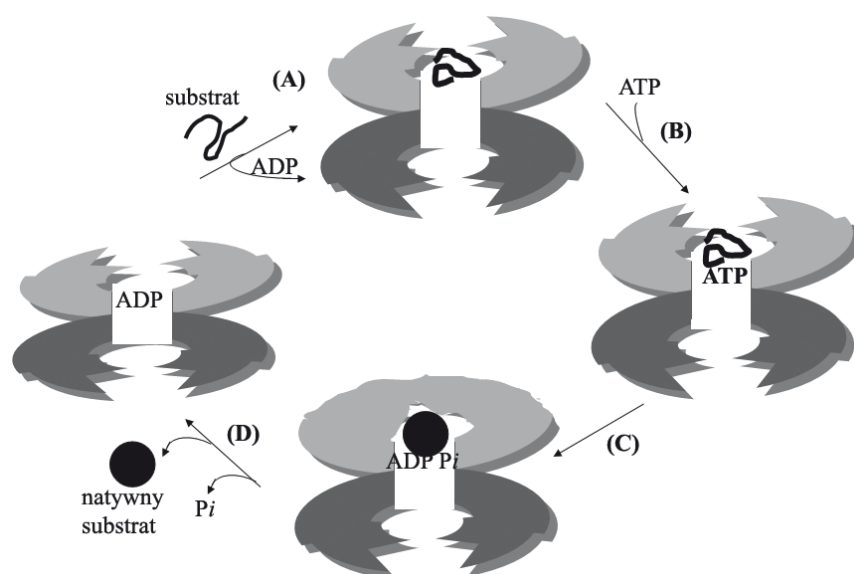
BIAŁKA OPIEKUŃCZE CCT

Białka opiekuńcze CCT, podobnie jak GroEL, zbudowane są z dwóch pierścieni ułożonych przeciwstawnie. Struktura przestrzenna CCT przypomina swym kształtem cylinder o średnicy około 150 Å i wysokości sięgającej 160 Å (SCHOEHN i współaut. 2000a, b). Z niewielkimi wyjątkami, pierścień CCT zbudowany jest z 8 różnych, choć homologicznych podjednostek, które wykazują 30% identyczności sekwencji nukleotydowej, oznaczonych greckimi literami α, β, γ, δ, ε, η, θ i ζ (COWAN i LEWIS 2001). Mają one ściśle ustalone położenie w pierścieniu i każdy monomer pojedynczego pierścienia oddziałuje tylko z jedną podjednostką drugiego.

Poziom CCT w komórce jest 10 razy niższy niż ma to miejsce w przypadku GroEL i wynosi około 0.1% wszystkich białek rozpuszczalnych. Szacuje się, że około 10% nowo po-

wstałych polipeptydów może być fałdowane przez CCT. Nie określono jednoznacznie, w jaki sposób CCT i GroEL rozpoznają swoje substraty wśród wielkiej liczby syntetyzowanych polipeptydów. W warunkach fizjologicznych mogą one łączyć się bezpośrednio z powstającym polipeptydem (SIEGERS i współaut. 2003), jak również oddziaływać z niesfałdowanym białkiem, uwolnionym z rybosomu za pośrednictwem Hsp70, czy przy udziale prefoldyny (GimC – u drożdży), jak w przypadku aktyny i tubuliny. Analogicznie do GroEL, miejscem rozpoznawania i wiązania substratu przez CCT jest jej apikalna część. Jednak precyzyjna lokalizacja tego miejsca nie została zdefiniowana.

Związanie substratu do CCT może nastąpić jedynie wówczas, kiedy domena bazalna nie jest połączona z ATP. Część apikalna CCT występuje wtedy w konformacji „otwartej” (Ryc. 4A). Na jej szczycie występuje dodatkowy region, który jest odpowiedzialny za odizolowanie niesfałdowanego polipeptydu od pozostałych białek, występujących w cyto-



Ryc. 4. Model przedstawiający cykl zmian konformacyjnych zachodzących w CCT w wyniku wiązania i hydrolizy ATP.

(a) białko opiekuńcze wolne od nukleotydu może przyłączyć niesfałdowany substrat do właściwych miejsc wiązania; (b) wiązanie ATP nie stanowi kryterium do wywołania zmian konformacyjnych w CCT; (c) dopiero hydroliza związanego ATP wywołuje zmianę konformacji przestrzennej CCT, co prowadzi do zamknięcia polipeptydu wewnątrz tunelu; (d) odłączenie nieorganicznego fosforanu P_i umożliwia powrót pierścienia CCT do konformacji otwartej, a tym samym uwolnienie polipeptydu do cytoplazmy. Powyżej przedstawiony cykl zachodzi przemienne, w jednym, a następnie w drugim pierścieniu. Mechanizm odpowiedzialny za utrzymanie pierścieni w różnym stanie aktywności nie został w pełni wyjaśniony. Na schemacie przedstawiono zmiany zachodzące tylko w jednym pierścieniu CCT (wg MEYERA i współaut. 2003, zmodyfikowana).

plazmie (VALPUESTA i współaut. 2002, MEYER i współaut. 2003). Po związaniu i hydrolizie ATP (Ryc. 4B) następują zmiany konformacyjne w apikalnej części CCT, w konsekwencji których jej górna część zamyka tunel, gdzie uwięziony zostaje polipeptyd przeznaczony do fałdowania (Ryc. 4C). Po odłączeniu fosforanu (P_i) ponownie mają miejsce zmiany strukturalne, prowadzące do osiągnięcia przez CCT konformacji otwartej (Ryc. 4D), czego efektem jest uwolnienie z niej polipeptydu.

Każdy monomer wchodzący w skład CCT może hydrolizować tylko jedną cząsteczkę ATP. W obrębie tego białka opiekuńczego, podobnie jak w przypadku GroEL, pierścienie aktywowane są w sposób naprzemienny i tylko jeden z nich w danym momencie może być zaangażowany w fałdowanie polipepty-

du. Wykazano również zjawisko negatywnej regulacji pomiędzy pierścieniami. Po związaniu cząsteczek ATP do jednego pierścienia, stwierdzono zmniejszenie powinowactwa wiązania nukleotydu w drugim (GUTSCHE i współaut. 2000, SPIESS i współaut. 2004).

W wielu laboratoriach prowadzone są badania nad funkcjonowaniem białek opiekuńczych w komórce. Pełne poznanie mechanizmu ich działania z pewnością dostarczy cennych informacji mogących mieć zastosowanie w opracowaniu metod leczenia chorób związanych z nieprawidłowym fałdowaniem białek. Niestety, wiele aspektów dotyczących oddziaływania białek opiekuńczych z ich substratami pozostaje nadal tajemnicą. Dalsze badania nad funkcją tych kompleksów w fałdowaniu białek mogą przynieść odpowiedzi na wiele nurtujących naukę i medycynę pytań.

PODSUMOWANIE

Wszystkie białka w komórce, zarówno nowo syntetyzowane polipeptydy, jak i rozfałdowane w wyniku działania czynników

stresowych, aby osiągnąć prawidłową konformację przestrzenną wymagają udziału wyspecjalizowanych narzędzi, jakimi są białka

opiekuńcze. Odgrywają one kluczową rolę w ułatwianiu prawidłowego zwijania białek *in vivo* i zapobiegają tworzeniu agregatów z nieprawidłowo sfałdowanych polipeptydów, które stanowią podłoże wielu chorób „konformacyjnych”. System białek opiekuńczych występujący w komórkach bakteryjnych i eukariotycznych można podzielić na dwie podstawowe grupy. Do grupy pierwszej zalicza się białka opiekuńcze związane z rybosomami, odpowiedzialne za ko-translacyjne zwija-

nie białek, do drugiej zaś – cytoplazmatyczne białka opiekuńcze, w skład których wchodzi białko szoku cieplnego Hsp90 i Hsp70/Hsp40 oraz CCT w komórkach eukariotycznych. U Prokariota ich odpowiednikami jest system DnaK/DnaJ i GroEL/GroES. Artykuł ten jest próbą scharakteryzowania udziału poszczególnych białek opiekuńczych w procesie fałdowania polipeptydów w komórkach bakteryjnych i eukariotycznych.

MOLECULAR CHAPERONS: CHAPERONES AND CHAPERONINS

Summary

Proteins must be folded into their correct three-dimensional conformation in order to attain biological function. Conversely, protein aggregation and misfolding are primary contributors to many devastating “conformational” diseases. Proteins are synthesized and folded continuously. The last of these processes is greatly assisted by molecular chaperones. They are a group of structurally diverse and mechanistically distinct proteins that either promote folding or prevent the aggregation of other proteins.

Proteins that can be classified as molecular chaperones can be divided into two groups: (a) ribosome-associated chaperons responsible for co-translational folding of polypeptides and (b) cytoplasmic molecular chaperones including Hsp90, Hsp70/Hsp40 and chaperonin CCT in eukaryotic cells. Prokaryotic cells possess DnaK/DnaJ system and GroEL/GroES, respectively. This review focuses on the emerging role of molecular chaperones in protein quality control in eukaryotic and prokaryotic cells.

LITERATURA

- BARRAL J. M., BROADLEY S. A., SCHAFFAR G., HARTL F. U., 2004. *Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases*. Semin. Cell Dev. Biol. 15, 17–29.
- BREGIER C., KUPIKOWSKA B., FABCZAK H., FABCZAK S., 2008. *Chaperoniny CCT i białka współdziałające*. Postępy Biochem. (w druku).
- BUCHBERGER A., 2002. *From UBA to UBX: new words in the ubiquitin vocabulary*. Trends Cell Biol. 12, 216–221.
- BUCKLE A. M., ZAHN R., FERSHT A. R., 1997. *A structural model for GroEL-polypeptide recognition*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 3571–3575.
- BUKAU B., WEISSMAN J., HORWICH A., 2006. *Molecular chaperones and protein quality control*. Cell 125, 443–451.
- COWAN N. J., LEWIS S. A., 2001. *Type II chaperonins, prefoldin, and the tubulin-specific chaperones*. Adv. Protein Chem. 59, 73–104.
- ELLIS R. J., HARTL F. U., 1996. *Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function*. FASEB J. 10, 20–26.
- ELLIS R. J., 1997. *Do molecular chaperones have to be proteins?* Biochem. Biophys. Res. Commun. 238, 687–692.
- FARR G. W., FURTAK K., ROWLAND M. B., RANSON N. A., SAIBIL H. R., KIRCHHAUSEN T., HORWICH A. L., 2000. *Multivalent binding of nonnative substrate proteins by the chaperonin GroEL*. Cell 100, 561–573.
- FENTON W. A., KASHI Y., FURTAK K., HORWICH A. L., 1994. *Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release*. Nature 371, 614–619.
- FERBITZ L., MAIER T., PATZELT H., BUKAU B., DEUERLING E., BAN N., 2004. *Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins*. Nature 431, 520–522.
- FRANKE J., REIMANN B., HARTMANN E., KÖHLERL M., WIEDMANN B., 2001. *Evidence for a nuclear passage of nascent polypeptide-associated complex subunits in yeast*. J. Cell Sci. 114, 2641–2648.
- GAUTSCHI M., MUN A., ROSS S., ROSPERT S., 2002. *A functional chaperone triad on the yeast ribosome*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 4209–4214.
- GENEVAUX P., KEPPEL F., SCHWAGER F., LANGENDIJK-GENEVAUX P. S., HARTL F. U., GEORGIOPOULOS C., 2004. *In vivo analysis of the overlapping functions of DnaK and trigger factor*. EMBO Rep. 5, 195–200.
- GRALLATH S., SCHWARZ J. P., BOTTCHER U. M., BRACHER A., HARTL F. U., SIEGERS K., 2006. *L25 functions as a conserved ribosomal docking site shared by nascent chain-associated complex and signal-recognition particle*. EMBO Rep. 7, 78–84.
- GRANTCHAROVA V., ALM E. J., BAKER D., HORWICH A. L., 2001. *Mechanisms of protein folding*. Curr. Opin. Struct. Biol. 11, 70–82.
- GUTSCHE I., ESSEN L. O., BAUMEISTER W., 1999. *Group II chaperonins: new TRiC(k)s and turns of a protein folding machine*. J. Mol. Biol. 293, 295–312.
- GUTSCHE I., HOLZINGER J., ROSSLE M., HEUMANN H., BAUMEISTER W., MAY R. P., 2000. *Conformational rearrangements of an archaeal chaperonin upon ATPase cycling*. Curr. Biol. 10, 405–408.
- HARTL F. U., HAYER-HARTL M., 2002. *Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein*. Science 295, 1852–1858.
- HORWICH A. L., FENTON W. A., CHAPMAN E., FARR G. W., 2007. *Two families of chaperonin: physiology and mechanism*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 23, 115–145.
- HOURLY W. A., 2001. *Chaperone-assisted protein folding in the cell cytoplasm*. Curr. Protein Pept. Sci. 2, 227–244.

- HUNDLEY H. A., WALTER W., BAIRSTOW S., CRAIG E. A., 2005. *Human Mpp11 J protein: ribosome-tethered molecular chaperones are ubiquitous*. Science 308, 1032–1034.
- KEDZIERSKA S., STANISZEWSKA M., WĘGRZYN A., TAYLOR A., 1999. *The role of DnaK/DnaJ and GroEL/GroES systems in the removal of endogenous proteins aggregated by heat-shock from Escherichia coli cells*. FEBS Lett. 446, 331–337.
- KRAMER G., RUTKOWSKA A., WĘGRZYN R. D., PATZELT H., KURZ T. A., MERZ F., RAUCH T., VORDERWÜLBECKE S., DEUERLING E., BUKAU B., 2004a. *Functional dissection of Escherichia coli trigger factor: unraveling the function of individual domains*. J. Bacteriol. 186, 3777–3784.
- KRAMER G., PATZELT H., RAUCH T., KURZ T. A., VORDERWÜLBECKE S., BUKAU B., DEUERLING E., 2004b. *Trigger factor peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity is not essential for the folding of cytosolic proteins in Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 279, 14165–14170.
- LEE S., TSAI F. T., 2005. *Molecular chaperones in protein quality control*. J. Biochem. Mol. Biol. 38, 259–265.
- LEVY-RIMLER G., BELL R. E., BEN-TAL N., AZEM A., 2002. *Type I chaperonins: not all are created equal*. FEBS Lett. 529, 1–5.
- LINDQUIST S., CRAIG E. A., 1988. *The heat-shock proteins*. Annu. Rev. Genet. 22, 631–677.
- MAYER M. P., BUKAU B., 1999. *Molecular chaperones: the busy life of Hsp90*. Curr. Biol. 9, R322–325.
- MEYER A. S., GILLESPIE J. R., WALTHER D., MILLET I. S., DONIACH S., FRYDMAN J., 2003. *Closing the folding chamber of the eukaryotic chaperonin requires the transition state of ATP hydrolysis*. Cell 113, 369–381.
- OTTO H., CONZ C., MAIER P., WÖLFLE T., SUZUKI C. K., JENÖ P., RÜCKNAGEL P., STAHL J., QIU X. B., SHAO Y. M., MIAO S., WANG L., 2006. *The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones*. Cell. Mol. Life Sci. 63, 2560–2570.
- ROSPERT S., DUBAQUIÉ Y., GAUTSCHI M., 2002. *Nascent polypeptide-associated complex*. Cell. Mol. Life Sci. 59, 1632–1639.
- SCHOEHN G., QUAITE-RANDALL E., JIMENEZ J. L., JOACHIMIAK A., SAIBIL H. R., 2000a. *Three conformations of an archaeal chaperonin, TF55 from Sulfolobus shibatae*. J. Mol. Biol. 296, 813–819.
- SCHOEHN G., HAYES M., CLIFF M., CLARKE A. R., SAIBIL H. R., 2000b. *Domain rotations between open, closed and bullet-shaped forms of the thermosome, an archaeal chaperonin*. J. Mol. Biol. 301, 323–332.
- SIEGERS K., BOLTER B., SCHWARZ J. P., BOTTCHER U. M., GUHA S., HARTL F. U., 2003. *TRiC/CCT cooperates with different upstream chaperones in the folding of distinct protein classes*. EMBO J. 22, 5230–5240.
- SPIESS C., MEYER A. S., REISSMANN S., FRYDMAN J., 2004. *Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets*. Trends Cell Biol. 14, 598–604.
- SPRETER T., PECH M., BEATRIX B., 2005. *The crystal structure of archaeal nascent polypeptide-associated complex (NAC) reveals a unique fold and the presence of a ubiquitin-associated domain*. J. Biol. Chem. 280, 15849–15845.
- TURNER G. C., VARSHAVSKY A., 2000. *Detecting and measuring cotranslational protein degradation in vivo*. Science 289, 2117–2120.
- VALPUESTA J. M., MARTIN-BENITO J., GOMEZ-PUERTAS P., CARRASCOSA J. L., WILLISON K. R., 2002. *Structure and function of a protein folding machine: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT*. FEBS Lett. 529, 11–16.
- WALL D., ZYLICZ M., GEORGIOPOULOS C., 1995. *The conserved G/F motif of the DnaJ chaperone is necessary for the activation of the substrate binding properties of the DnaK chaperone*. J. Biol. Chem. 270, 2139–2144.
- WĘGRZYN R. D., DEUERLING E., 2005. *Molecular guardians for newborn proteins: ribosome-associated chaperones and their role in protein folding*. Cell. Mol. Life Sci. 62, 2727–2738.
- ZIETKIEWICZ S., LEWANDOWSKA A., STOCKI P., LIBEREK K., 2006. *Hsp70 chaperone machine remodels protein aggregates at the initial step of Hsp70–Hsp100-dependent disaggregation*. J. Biol. Chem. 281, 7022–7029.