



УДК 577.151.3;577.152.34

АТР-ЗАВИСИМЫЕ Lon-ПРОТЕАЗЫ В СИСТЕМЕ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА КЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ

© 2022 г. А. М. Куджаев*, А. Г. Андрианова*, А. Е. Гущина**, И. В. Смирнов*, Т. В. Ротанова*,#

*ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

**Protein Structure Section, Center for Structural Biology, National Cancer Institute, Frederick, MD 21702, USA

Поступила в редакцию 09.11.2021 г.

После доработки 19.11.2021 г.

Принята к публикации 24.11.2021 г.

Система контроля качества белков (СКК) играет ведущую роль в поддержании сохранности клеточного протеома во всех природных царствах. В обзоре обобщены сведения о строении и структурных особенностях молекулярных шаперонов и энергозависимых протеаз, формирующих СКК, показана важная роль белков, принадлежащих к AAA⁺-суперсемейству, дана развернутая характеристика АТР-зависимых Lon-протеаз как особого семейства в СКК, обсуждены различия между ферментами отдельных подсемейств Lon-протеаз, приведены современные данные о структуре и уникальных механизмах функционирования AAA⁺-белков — представителей СКК.

Ключевые слова: контроль качества клеточного протеома, AAA⁺-белки, молекулярные шапероны, АТР-зависимый протеолиз, Lon-протеазы, 3D-структура, крио-ЭМ

DOI: 10.31857/S0132342322040133

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	381
Система контроля качества белков в клетках бактерий и эукариот.....	382
Молекулярные шапероны системы контроля качества белков.....	382
Внутриклеточные АТР-зависимые протеазы и мультисубъединичные протеолитические комплексы.....	387
Lon-протеазы как особое семейство в системе контроля качества клеточных белков.....	395
Общая характеристика семейства Lon. Подсемейства Lon-протеаз.....	395
LonA-протеазы — уникальный подкласс AAA ⁺ -белков.....	396
Современные представления о структурных особенностях и механизмах функционирования LonA-протеаз и других AAA ⁺ -белков системы контроля качества.....	401
Спиральная организация гексамеров AAA ⁺ -белков — базовое условие транслокации белковых мишеней/субстратов.....	401

Крио-ЭМ-структуры EcLon и других LonA-протеаз.....	403
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	408
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	409

ВВЕДЕНИЕ

Поддержание гомеостаза клеточных белков имеет первостепенное значение для роста и выживания клеток. Существование внутриклеточных белков в нативном состоянии — необходимое условие для выполнения клеткой самых разнообразных функций. Однако вследствие возможных ошибок в транскрипции и трансляции, мутаций генома и различных стрессовых воздействий в клетках накапливаются поврежденные и мутантные белки, а также белки с нарушенной структурой, которые не только утрачивают функции, свойственные нативным белкам, но и могут формировать токсичные для клетки неупорядоченные агрегаты. Известно также, что до 30% вновь синтезированных белков никогда не достигают нативного состояния, что создает серьезную угрозу функционированию и жизнеспособности клеток. Кроме того, нарушение сворачивания (фолдинга) клеточных белков и их агрегация — основные причины развития как возрастных дегенеративных заболеваний, так и различных других патологий.

Сокращения: СКК — система контроля качества; крио-ЭМ — криоэлектронная микроскопия; АТР-γ-S — аденозин-5'-[γ-тио]трифосфат; СС — конформация coiled-coil.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 335-42-22; эл. почта: tatiana.rotanova@ibch.ru).

Для преодоления нарушений протеостаза в клетках сформировались мощные сети системы контроля качества (СКК) белков, которая играет ведущую роль в поддержании сохранности клеточного протеома во всех природных царствах. Семейство АТР-зависимых Lon-протеаз — один из ключевых участников СКК.

СИСТЕМА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА БЕЛКОВ В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ И ЭУКАРИОТ

Система контроля качества внутриклеточных белков состоит из молекулярных шаперонов и энергозависимых протеаз (рис. 1) [1–3]. Компоненты СКК контролируют сворачивание вновь синтезированных полипептидов и их сборку в функциональные комплексы, обеспечивают распознавание и высокоэффективное связывание

белков с нарушенной структурой и их последующий рефолдинг, а также осуществляют выборочное удаление из клетки избыточных и поврежденных белков путем их деградации энергозависимыми протеазами (в бактериях, а также в митохондриях и хлоропластах эукариот) или мультикомпонентной убиквитин-протеасомной системой (в цитозоле эукариот) [4–7].

Молекулярные шапероны системы контроля качества белков

Сообщество молекулярных шаперонов СКК [2, 8, 9] наряду с триггер-фактором (ТФ, 48 кДа), связанным с рибосомой и участвующим в ко-трансляционном сворачивании новосинтезированных белков [10], включает целый ряд семейств белков теплового шока (Heat shock proteins, Hsps), различающихся молекулярными массами (от 12–

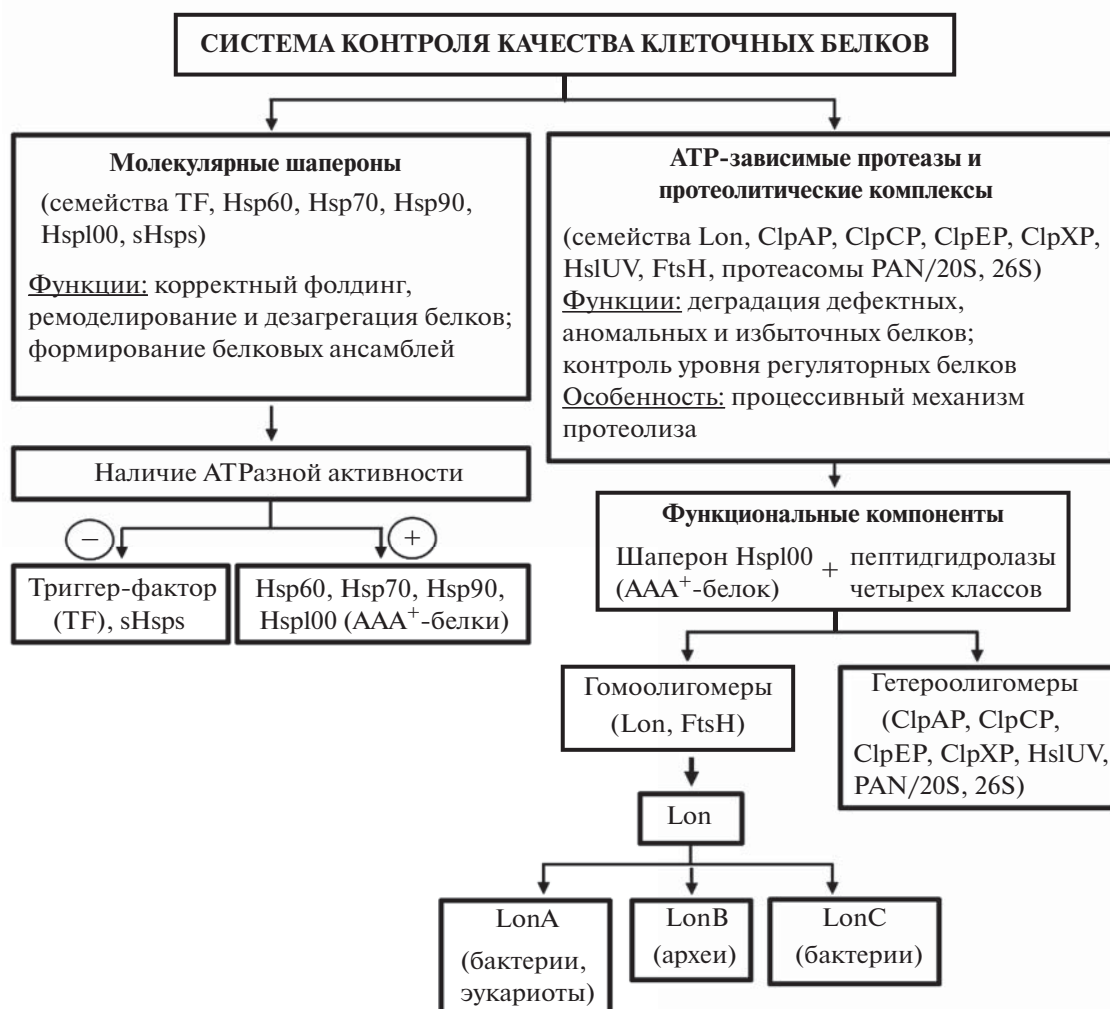


Рис. 1. Компоненты системы контроля качества клеточных белков.

43 кДа у sHsps (small Hsps, малые белки теплового шока) до 100 кДа у белков семейства Hsp100) (рис. 1) [2, 9, 11–15]. При этом белки Hsp60, Hsp70, Hsp90 и Hsp100 (табл. 1) обладают АТФазной активностью, что определяет динамический характер их существования и обеспечивает высокую конформационную гибкость. Условно молекулярные шапероны разделяются на группы фолдеров, холдеров и анфолдеров [16]. Фолдеры (семейства Hsp60, Hsp70 и Hsp90) участвуют в сворачивании белковых мишеней, предотвращая нежелательные взаимодействия между белками, еще не достигшими нативного состояния; холдеры (sHsps) удерживают частично фолдированные мишени, не влияя на их конформацию; анфолдеры (Hsp100), обладающие транслоказной активностью, разворачивают белковые субстраты [9, 16]. Для большинства семейств шаперонов получены данные рентгеноструктурного анализа их представителей [17].

Высококонсервативное семейство шаперонов Hsp70, участвующее в большом количестве разнообразных биологических процессов, сформировано, главным образом, каноническими белками DnaK у бактерий и подобными им белками Hsp70 у эукариот [12, 18]. Сверх того, эукариоты содержат также ряд неканонических шаперонов Hsp70, таких как белки Grp78, Grp170 и Hsp110 [19]. Представители семейства локализованы как в цитозоле, так и в различных органеллах (мито-

хондрии, эндоплазматический ретикулум, хлоропласты) [12, 18].

В физиологических условиях шапероны Hsp70 способствуют фолдингу белковых мишеней, а при стрессе они предотвращают агрегацию развернутых белков и, кроме того, совместно с шаперонами семейства Hsp100 проводят сольюбилизацию и рефолдинг агрегированных белков [20]. В структуре Hsp70 различают три домена: *N*-концевой АТФазный, центральный субстрат-связывающий и вариабельный *C*-концевой, который участвует как в связывании мишеней, так и во взаимодействии с различными партнерскими белками и модулировании шапероновой функции [9, 18].

Функционирование Hsp70 основано на изменении сродства шаперона к белковым мишеням в зависимости от природы связанного нуклеотида — АТФ-форма Hsp70 проявляет пониженную по сравнению с ADP-формой аффинность к белкам. Регуляторами АТФазной и шапероновой активностей Hsp70 служат кошапероны группы Hsp40/J-домен-содержащих белков и факторы нуклеотидного обмена (NEF) (табл. 1) [9, 21]. Связывание белков-мишеней с шапероном опосредуется предварительным образованием комплексов субстрат—кошаперон с участием *C*-концевого домена Hsp40, после чего комплекс доставляется к Hsp70. Взаимодействие АТФазного домена шаперона с *N*-концевым J-доменом Hsp40 стимулирует гидролиз связанного

Таблица 1. Системы АТФ-зависимых шаперонов СКК (по данным работы Saibil [13])

Шапероны	Кофакторы	Основные функции
Система Hsp60 (шаперонины)		
GroEL (<i>Escherichia coli</i>), HSP60/CPN60, CCT (млекопитающие), thermosome (археи)	GroES, HSP10/CPN10, prefoldin	Фолдинг и предотвращение агрегации белков
Система Hsp70		
DnaK (<i>E. coli</i>), HSP70, Ssa, Ssb (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>), BiP/GRP78 (млекопитающие, растения)	DnaJ, GrpE, NEF, HSP40, Sis1, Hdj1, Hsp110, Grp170, Sil1	Разворачивание, дезагрегация и фолдинг белков, стабилизация полипептидов, регуляция ответа на тепловой шок, отбор субстратов для деградации
Система Hsp90		
Hsp70 (<i>E. coli</i>), GRP94, TRAP1 (эукариоты), Hsc82, Hsp82 (дрожжи)	HOP, p50, ANA1, AIP, FKBP52, p23, UNC45	Связывание, стабилизация и созревание стероидных рецепторов и протеинкиназ, регуляция отбора и превращений субстратов, сборка миозина
Система Hsp100 (AAA ⁺ -белки)		
ClpA, ClpB, ClpC, ClpE, ClpX, HslU (бактерии, эукариоты), PAN (археи), p97, Hsp104, Hsp101, Hsp78, RPT1—RPT6 (эукариоты)	DnaK/HSP70, ClpS	Разворачивание и ремоделирование белков, термотолерантность, сольюбилизация белковых агрегатов

АТР, а действие фактора NEF ускоряет последующие стадии высвобождения нуклеотида (в ADP-форме) и связывания новой молекулы АТР, сопровождающиеся диссоциацией белкового субстрата.

В недавних исследованиях установлено, что и эукариотические шапероны Hsp70, и бактериальные DnaK существуют не только в мономерной форме, но и как димеры, тримеры и более высокие олигомеры. На равновесие в таких смесях влияет присутствие нуклеотида и его природа (АТР или ADP) [22].

Шапероны Hsp60 или шаперонины оказались первым идентифицированным семейством шаперонов, для которого была выявлена важная роль в биогенезе клеточных белков и которое широко распространено в бактериях и в митохондриях, пластидах и цитоплазме эукариот (табл. 1) [12, 18]. Функциональными структурами шаперонинов служат тетрадекамеры, образованные двумя гептамерными кольцами, в каждом из которых сформирована центральная полость. Эти структуры способны в своих противоположных полостях попеременно связывать и инкапсулировать белки, подлежащие рефолдингу [9].

Наиболее изученный представитель семейства Hsp60 – шаперонин GroEL из *Escherichia coli*, функционирующий в комплексе с кошаперонином GroES – белком теплового шока семейства Hsp10 (табл. 1) [9, 12, 18, 23, 24]. Мономеры GroEL построены из трех доменов: апикального (Ap), шарнирного промежуточного (Hinge) и С-концевого экваториального (Eq), несущего АТР-связывающий центр [23–25]. Кольцевые гептамеры GroEL, состыкованные своими Eq-доменами, образуют зеркально симметричные тороиды с двумя изолированными гидрофобными полостями, способными в АТР-связанном состоянии размещать развернутые полипептиды размером до 60 кДа [9, 12]. Кошаперонины GroES, которые также образуют циклические куполообразные гептамеры, поочередно прикрывают торцы тороида GroEL, взаимодействуя с его входными отверстиями, сформированными Ap-доменами. Эти превращения в сопряжении с гидролизом АТР вызывают значительные конформационные изменения шаперонина, которые приводят к увеличению размеров и гидрофилизации полости, содержащей инкапсулированный субстрат, а это способствует фолдингу мишени, последующему ее высвобождению вместе с ADP и кошаперонином из комплекса с GroEL и началу нового цикла рефолдинга белкового субстрата [9, 12].

Следует отметить, что при фолдинге крупных субстратов, в том числе мультидоменных белковых мишеней, инкапсулирование которых в полость комплекса GroEL/GroES невозможно, реализуется альтернативный механизм, согласно которо-

му связывание определенного фрагмента белка-мишени и кошаперонина GroES происходит на противоположных кольцах тетрадекамера GroEL [9, 26].

Шапероны Hsp90 присутствуют в высоких концентрациях в бактериях и эукариотах и не обнаруживаются в археях. У бактерий обычно выявляется единственный Hsp90-шаперон, в то время как эукариоты содержат по два шаперона в цитозоле, и, кроме того, белки Hsp90 локализованы в митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме и в хлоропластах [27–29]. Эукариотические шапероны Hsp90 функционируют в составе комплексов систем, включающих как другие шапероны (в частности, Hsp70), так и сеть разнообразных кошаперонов (табл. 1) [9, 12, 27–30]. Семейство Hsp90 вовлечено в процессы созревания ключевых сигнальных белков, а также участвует в сборке и разборке различных белковых комплексов. Белками-клиентами для Hsp90 служат различные протеинкиназы, факторы транскрипции, рецепторы стероидных гормонов и др. Интересно, что бактериальные шапероны Hsp90 не имеют собственных кошаперонов, и их ремоделирующая функция обеспечивается исключительно путем взаимодействия с системой шаперона Hsp70 [31].

По структурной организации Hsp90 – это гомодимеры, протомеры которых включают N-концевой нуклеотид-связывающий (N) и центральный (M) домены, формирующие АТР-связывающий модуль, а также С-концевой домен, ответственный за димеризацию шаперона [28, 29]. Частично развернутые клиентские белки зачастую доставляются к Hsp90 посредством системы шаперона Hsp70 и связываются с М- и С-доменами Hsp90. Регуляция функциональной активности Hsp90-белков эукариот осуществляется с помощью набора кошаперонов, которые в определенном порядке связываются с разными доменами шаперона, включая специфический С-концевой мотив MEEVD, отсутствующий у бактериальных Hsp90. Апо-форма Hsp90, представляющая собой “раскрытый” V-образный димер, образует сложный комплекс с белком-клиентом и необходимыми кошаперонами. Взаимодействие этого комплекса с АТР приводит к возникновению контактов между N-доменами с образованием “закрытой” формы шаперона и к ремоделированию связанной на его поверхности белковой мишени. В результате гидролиза АТР происходит диссоциация N-доменов с образованием ADP-связанного “полуоткрытого” V-димера, из которого высвобождаются белок-клиент, ADP и неорганический фосфат, а Hsp90 вновь принимает открытую конформацию [28, 29]. Следует отметить, что для достижения нативного состояния освобожденный субстрат обычно нуждается в дополнительных стадиях рефолдинга [12, 28].

В то время как рассмотренные выше семейства Hsp60, Hsp70 и Hsp90 составляют группу шаперонов-фолдеров, малые белки теплового шока (sHsps) выполняют роль холдеров в системе контроля качества клеточных белков. Шапероны sHsps образуют прочные долгоживущие комплексы с широким набором клеточных белков в их ненативных конформациях и тем самым предотвращают агрегацию субстратов [32–35]. Белки sHsps представляют собой наиболее распространенное, но низкоксервативное семейство шаперонов. Их общим отличительным признаком служит наличие в центральной части последовательности домена размером ~100 а.о. со структурой α -кристаллина хрусталика глаза млекопитающих, который фланкирован неструктурированными *N*- и *C*-концевыми фрагментами протяженностью 24–247 а.о. и <20 а.о. соответственно [9, 12, 32–36].

Характерная особенность sHsp-шаперонов – полидисперсность их четвертичных структур, что отражается в формировании ансамблей из крупных олигомеров с изменяющимся числом субъединиц. В частности, в клетках человека олигомеры могут включать 12–32 субъединицы sHsp-шаперона [36], а в клетках растений – до 40 [37]. Такие олигомеры часто имеют консервативную структурную организацию в виде сферического или дискообразного комплекса с пронизывающим его центральным каналом [33–36].

В противоположность другим семействам шаперонов, каждый олигомер sHsp способен удерживать по несколько молекул белковых мишеней, высвобождение которых из комплексов с sHsps происходит в кооперации с АТР-зависимыми шаперонами. На этом основании sHsp-белки рассматриваются в качестве “резервуаров” ненативных белков, сохраняющих их для последующего рефолдинга с помощью других семейств шаперонов, в частности системы шаперона Hsp70 [9, 12, 33–35].

В то же время следует заметить, что несмотря на значительный прогресс в понимании механизмов функционирования sHsp-шаперонов, достигнутый за последнее время, вопросы их специфичности, связанные с разнообразием последовательностей и структур шаперонов, остаются малоизученными и требуют дальнейшего исследования.

Семейство Hsp100/Clp, вовлеченное во множество важнейших клеточных процессов (в том числе в мембранный транспорт, регуляцию цитоскелета, биогенез органелл, инициацию репликации ДНК и активацию транскрипции), занимает особое место в системе контроля качества клеточных белков. Шапероны Hsp100 представляют группу “анфолдеров”, которые, с одной стороны, осуществляют разворачивание белковых мишеней перед последующими стадиями фол-

динга, а с другой – служат АТР-зависимыми компонентами всех протеаз и мультисубъединичных комплексов СКК, деградирующих белки-субстраты. Эти шапероны принадлежат к широко распространенному суперсемейству AAA⁺-белков (АТРаз, ассоциированных с различными клеточными активностями) (рис. 1), которые функционируют как кольцевые гексамерные структуры, использующие энергию гидролиза АТР для ремоделирования своих белковых мишеней [38–41]. Hsp100-семейство в бактериях представлено белками ClpA, ClpB, ClpC, ClpE, ClpX, ClpY (HslU) и некоторыми другими (в частности, АТР-зависимыми составляющими Lon- и FtsH-протеаз) (табл. 1) [2, 9, 12, 41]. У эукариот подобные белки, относящиеся к семействам Hsp104, Hsp101 и Hsp78, встречаются в митохондриях клеток млекопитающих, а также в растениях и дрожжах [12, 42, 43].

По количеству АТР-зависимых составляющих представители семейства Hsp100 делятся на два класса: к классу I относятся белки, включающие два так называемых AAA⁺-модуля (D1 и D2, рис. 2), а к классу II – белки, содержащие только один такой модуль D (рис. 2) [9, 41]. Кроме АТР-зависимых модулей AAA⁺-белки содержат также структурно независимые вспомогательные домены (экстрадомены), которые либо расположены перед AAA⁺-модулями (*N*-концевые (*N*) и Zn-связывающие (*ZBD*) домены), либо локализованы внутри AAA⁺-модулей (инсерционные (*I*) домены) (рис. 2) [9, 41]. Представленные на рис. 2 белки Hsp104, ClpB и Hsp78 функционируют исключительно как шапероны, в то время как белки ClpA, ClpC, ClpE, ClpX и HslU в комплексах с протеолитическими составляющими (белками ClpP или HslV, см. ниже) осуществляют селективную деградацию внутриклеточных белков. Шапероны Hsp104 отличаются от других представителей семейства наличием небольшого *C*-концевого домена (рис. 2), участвующего в формировании функционально активной структуры шаперона и во взаимодействии с белками-субстратами [44, 45].

Ремоделирование белков-мишеней шаперонами Hsp100/Clp включает ряд последовательных стадий. Отбор субстратов происходит путем взаимодействия шаперонов с неструктурированными участками мишеней, содержащими специфические мотивы узнавания (дегроны), причем в некоторых случаях связывание субстратов опосредуется участием дополнительных адаптерных белков [41]. Связывание нуклеотидов способствует стабилизации бочкообразной гексамерной структуры шаперона, а разворачивание мишеней осуществляется путем их “принудительного” перемещения (транслокационная активность шаперона) через центральный канал гексамера Hsp100/Clp за счет энергии гидролиза АТР. На следующей стадии развернутые белки высвобож-

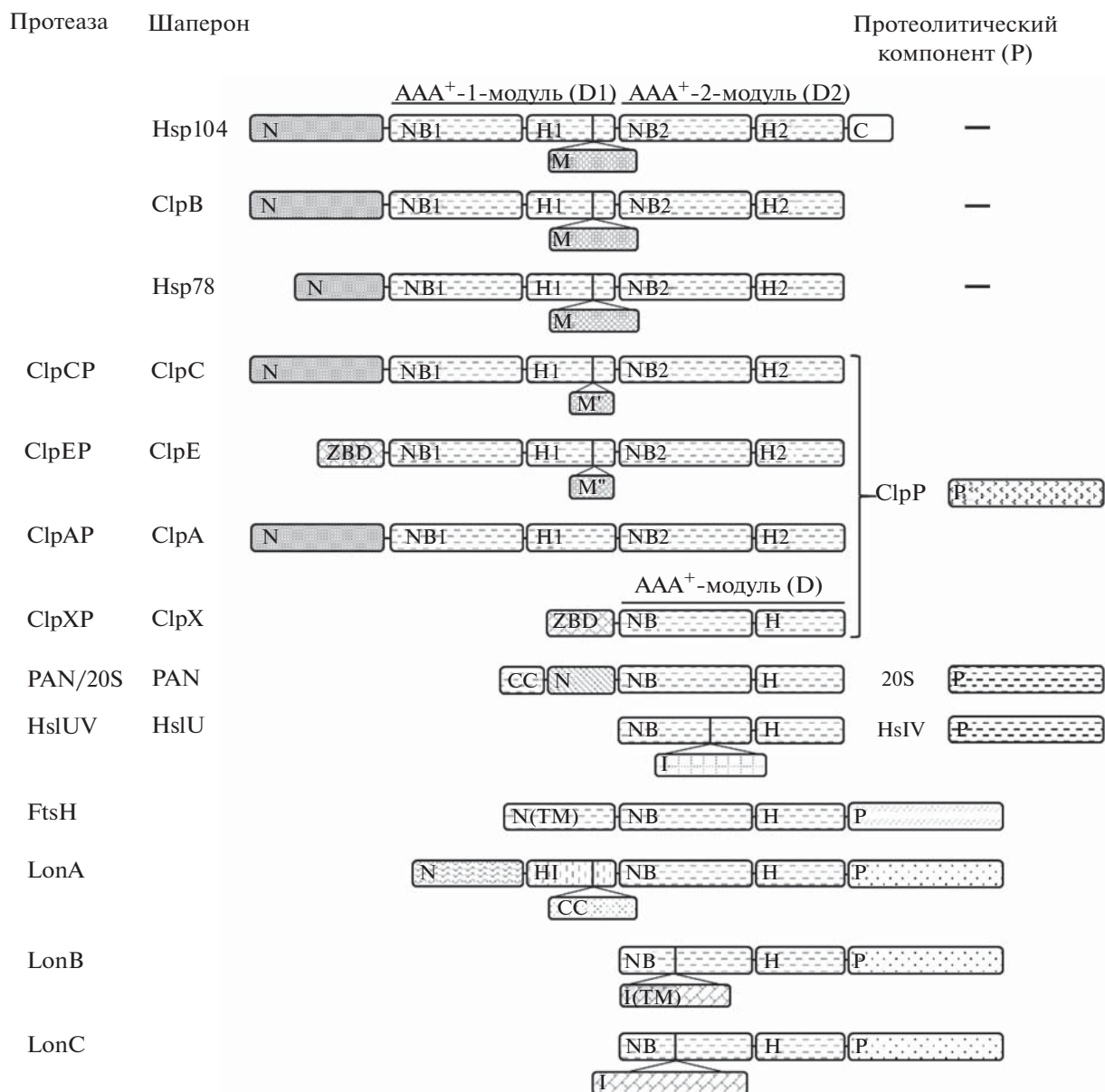


Рис. 2. Доменная организация молекулярных шаперонов семейства Hsp100 и АТФ-зависимых протеаз системы контроля качества белков. N — N-концевые домены; ZBD — цинк-связывающие домены; NB, NB1 и NB2 — нуклеотид-связывающие домены; M, M' и M'' — вставочные (middle) домены; I — инсерционные домены; H, H1 и H2 — α -спирализованные домены; C — C-концевой домен; P — протеазные субъединицы/домены; CC — coiled-coil-область; TM — трансмембранные фрагменты.

даются из комплексов с шаперонами благодаря конформационным изменениям последних, обусловленным преобразованием АТФ в АДФ, и подвергаются рефолдингу — либо спонтанному, либо с участием молекулярных шаперонов других семейств, что определяется специфичностью субстрата [44–47].

Наиболее изученные представители семейства Hsp100 — бактериальные шапероны ClpB и белок Hsp104 из дрожжей, которые вместе с менее исследованным шапероном Hsp78 отличаются от

шаперонов других семейств СКК проявлением дезагрегационной функции наряду с транслокационной и анфолдазной [48]. Это свойство шаперонов ClpB/Hsp104, относящихся к AAA^+ -белкам класса I, обусловлено наличием в их первом AAA^+ -модуле (D1) вставочного пропеллерообразного домена (“сердинный” или middle (M) domain) с конформацией coiled-coil (CC) (рис. 2) [49]. Следует отметить, что шапероны-деагрегазы семейства Hsp100 обнаруживаются в бактери-

ях, дрожжах и растениях и не встречаются в клетках теплокровных животных [50, 51].

Дезагрегирующая функция ClpV и Hsp104 реализуется совместно с белками системы шаперона Hsp70/DnaK (табл. 1) [52], роль которых заключается в изменении физических свойств белковых агрегатов, что приводит к высвобождению отдельных полипептидов из агрегированных субстратов и перемещению их к AAA⁺-шаперону. Подвижный М-домен, локализующийся на внешней стороне гексамерного кольца ClpV, регулирует как АТРазную активность самого шаперона, так и DnaK-зависимое связывание мишени с аксиальным каналом ClpV [53]. Далее происходят транслокация и разворачивание полипептида с последующим высвобождением его в среду для рефолдинга [47].

Внутриклеточные АТР-зависимые протеазы и мультисубъединичные протеолитические комплексы

Все АТР-зависимые протеазы и протеолитические комплексы СКК относятся к суперсемейству AAA⁺-белков (рис. 1 и 2) и выступают критическими регуляторами состава клеточного протеома [2, 54–59]. Показано, что энергозависимый протеолиз отвечает за деградацию более чем 90% белков внутри клетки [55]. Этот процесс исключительно важен для устранения дефектных, неправильно свернутых или агрегированных белков, накопленных в результате стрессовых ситуаций, а также для регуляции внутриклеточного протеолиза при обычных условиях путем контроля концентрации большинства короткоживущих регуляторных белков [54–56, 59].

В клетках прокариот и в органеллах эукариот бифункциональные энергозависимые протеазы представлены пятью семействами гетероолигомерных ферментов (ClpAP, ClpCP, ClpEP, ClpXP, HslUV (ClpYQ)) и двумя семействами гомоолигомерных ферментов (FtsH и Lon – подсемейства LonA и LonC) [56, 57] (рис. 2). В археях аналогичные функции выполняются Lon-протеазами (подсемейство LonB) и мультисубъединичной архейной протеасомой (PAN/20S), которая представляет собой комплекс протеасомоактивирующей нуклеотидазы (proteasome-activating nucleotidase, PAN) с протеолитическим компонентом – 20S-протеасомой [58]. В цитоплазме и ядрах эукариот функционируют 26S-протеасомы – мультисубъединичные ансамбли, которые состоят из 20S-протеасом (протеолитические коры) и регуляторных 19S-комплексов, включающих AAA⁺-АТРазы [59, 60]. При этом все гетероолигомерные протеазы и протеолитические комплексы СКК характеризуются общей архитектурой: их бочкообразные гепта- или гексамеры, образованные

двухъярусными кольцами пептидгидролаз, активные сайты которых изолированы внутри центральной деградационной камеры, формируют комплексы с кольцевыми гексамерами AAA⁺-АТРаз регуляторных компонентов, которые проявляют анфолдазную активность, направленную на разворачивание белков-мишеней для последующей их транслокации в деградационную камеру [55–57].

АТРазные составляющие протеаз СКК, преобразующие энергию АТР в механическую работу, выполняют важнейшую роль в деградации белковых субстратов. Весь процесс превращения белка-субстрата можно разделить на отдельные этапы, при этом распознавание белковой мишени, ее разворачивание и транслокация в деградационную камеру осуществляются АТРазным компонентом AAA⁺-протеазы, а собственно гидролиз белка-субстрата – пептидазным.

Этап узнавания и связывания мишени, как правило, не зависит от АТР и может быть либо прямым, либо “косвенным”, т.е. опосредованным адаптерными белками. Специфическими мотивами узнавания часто служат упомянутые выше дегроны – пептидные фрагменты, локализованные вблизи (или внутри) неструктурированных N- или C-концевых областей белка, или даже N-концевые аминокислоты [54, 56, 57]. Известны также дегроны, представляющие собой “прикрепленные” пептидные последовательности (тэги). Один из ярких примеров тэга – фрагмент SsrA-tag – AAXXXXXALAA (где X – любая аминокислота), который узнается протеазами ClpAP, ClpXP, FtsH, Lon и архейной протеасомой [54, 56].

В отличие от АТР-зависимых протеаз бактерий и протеасом архей, функционирование 26S-протеасом эукариот обычно опосредовано предварительной селективной модификацией белков-мишеней, подлежащих деградации, путем ковалентного присоединения специфической метки – цепочки из нескольких молекул убиквитина (белок из 76 а.о.) [59–61]. Вследствие этого дегроны мишеней 26S-протеасом представлены двумя частями: универсальным полиубиквитиновым тэгом, обеспечивающим связывание мишени с регуляторным компонентом каталитического комплекса, и неструктурированным фрагментом, который служит областью инициации протеолиза [60, 61]. Вместе с тем показано, что возможен также убиквитин-независимый путь деградации белков 26S-протеасомой. Его реализации способствует ряд так называемых прямых протеасомных сигналов, к которым относятся либо специфические фрагменты последовательности, либо посттрансляционные модификации мишеней, либо их конъюгация с химическими веществами, приводящая к связыванию с протеасомой по принципу заряд-зарядовых взаимодействий [62].

пускает цикл гидролиза АТР, необходимый для транслокации субстрата [65].

Остаток Rf локализован в SRH-области (фрагмент полипептидной цепи из 15–20 а.о.), расположенной в С-концевой части NB-домена (рис. 3) [56, 64–68]. К этой же области относится остаток s1 (обычно аспарагин, реже — серин, треонин или гистидин), также взаимодействующий с γ -фосфатом молекулы АТР соседней субъединицы и координирующий взаимодействие атакующей молекулы воды с остатками WB-мотива.

Совокупность консенсусных мотивов SRH-области критически важна для передачи между субъединицами AAA⁺-комплекса сигналов конформационных изменений, сопровождающих акт гидролиза нуклеотида. Вследствие своей функциональной значимости и в силу отсутствия SRH-фрагмента в других нуклеотидтрифосфатазах, эта область служит отличительной характеристикой для белков AAA⁺-суперсемейства [64–66].

Кроме рассмотренных консенсусных элементов, NB-домены AAA⁺-белков содержат специфические фрагменты последовательности, которые формируют петли трех типов, обращенные внутрь аксиального (осевого) канала гексамера белка [69]. Это так называемые петли *rope loop-1* (или GYVG), *rope loop-2* и RKN, которые участвуют в связывании, разворачивании и перемещении молекулы белка-мишени внутри полости канала вплоть до протеолитической камеры (в случае AAA⁺-протеаз) (рис. 3). Петля RKN локализуется у входа в осевой канал, наиболее консервативная петля *rope loop-1* — в его центральной части, а петля *rope loop-2* — на выходе из канала. При этом ведущую роль в разворачивании белков-субстратов и обеспечении транслоказной активности AAA⁺-протеаз играют петли *rope loop-1*.

В малом Н-домене AAA⁺-модуля, сформированном четырьмя α -спиралями, локализован мотив *sensor-2* (рис. 3). Он содержит консервативный остаток аргинина (иногда — лизина) (s2), который взаимодействует с α -фосфатом АТР и опосредует конформационные изменения, сопряженные с циклом связывания/гидролиза нуклеотида, а также участвует в межсубъединичных взаимодействиях [64, 66]. Следует упомянуть, что в противоположность членам AAA⁺-суперсемейства у представителей классических AAA-АТРаз в положении s2 обычно содержится остаток аланина [64, 66].

Особенности доменной и структурной организации АТР-зависимых протеаз и мультисубъединичных комплексов. Известно, что подавляющее большинство AAA⁺-белков взаимодействует с функциональными белковыми партнерами, образуя комплексные гетероолигомерные структуры, АТРазные составляющие которых — самостоятельные субъединицы [64]. В редких случаях АТРазный и функциональный компоненты AAA⁺-белка лока-

лизованы в единой полипептидной цепи [56, 64, 70]. С другой стороны, как упоминалось выше, суперсемейство AAA⁺-белков делится на классы I и II [41]. В первом случае AAA⁺-белки содержат два AAA⁺-модуля (D1 и D2), разделенных вставками разной длины, а во втором — единственный AAA⁺-модуль (D), подобный D2-модулю белков класса I [41]. В этом отношении сообщество АТР-зависимых протеаз системы контроля качества белков объединяет представителей обоих классов AAA⁺-белков: к классу I относятся АТРазные компоненты ClpAP/CP/EP-протеаз, а к классу II — протеаз ClpXP, HslUV, FtsH, Lon и комплексов архейных PAN/20S-протеасом и эукариотических 26S-протеасом [56, 70]. Доменное строение протеаз СКК показано на рис. 2, а их структурная организация охарактеризована в табл. 2.

АТРазные и протеазные составляющие семейств Lon и FtsH локализованы в единой полипептидной цепи, и эти ферменты функционируют как гомоолигомеры. Однако большинство AAA⁺-протеаз — это гетероолигомерные комплексы, в которых АТРазный и протеазный компоненты представлены индивидуальными субъединицами (рис. 2).

Особенность протеаз ClpCP и ClpEP — наличие в α -спирализованных доменах H1 их D1-модулей вставочных “серединных” (middle) доменов (M' и M''), обладающих СС-конформацией, но различающихся своими размерами. Показано, что эти домены участвуют во взаимодействии протеаз со специфическими адаптерными белками, которые опосредуют связывание и деградацию белковых мишеней [70, 71]. Подобные им вставочные домены (M), также имеющие СС-конформацию, обнаружены в шаперонах ClpB, Hsp104 и Hsp78 (рис. 2, см. подраздел “Молекулярные шапероны СКК”) [49, 72]. Однако M-домены более чем вдвое превышают M'- и M''-домены по размеру и выполняют другие функции — они обеспечивают дезагрегазную активность шаперонов [72].

Разнообразие протеазных компонентов АТР-зависимых протеаз и протеасом, вовлеченных в селективный АТР-зависимый протеолиз, отражено в табл. 2, из которой видно, что внутриклеточная деградация белков осуществляется ферментами, представляющими четыре разных клана в классификации пептидгидролаз MEROPS: каталитический центр протеолитической субъединицы ClpP, общей для гетероолигомерных протеаз ClpAP, ClpCP, ClpEP и ClpXP, представлен классической триадой Ser–His–Asp, у протеаз HslUV, а также в β -субъединицах 20S-протеасом архей и эукариот каталитически активны N-концевые остатки треонина, мембраносвязанная протеаза FtsH — Zn-зависимая металлопротеаза, а в активных центрах Lon-протеаз функционирует каталитическая диада Ser–Lys [73].

Таблица 2. Характеристика АТР-зависимых протеаз и протеолитических комплексов, осуществляющих селективный внутриклеточный протеолиз

		Функциональные компоненты (ФК)											
Протеаза/ комплекс		ФК в четв. структуре*	АТРазные компоненты					пептидгидролазные компоненты					
			название	n**	AAA ⁺ -модули		экстра- домен	название	n**	остатки каталитических центров	MEROPS		
					количест- во***	MD					Clan	Family	
AAA ⁺ -протеазы I класса													
ClpCP	Su	ClpC	6/12	2	M'	N	ClpP	14	Ser, His, Asp	SK	S14		
ClpEP	Su	ClpE	6/12	2	M''	N	ClpP	14	Ser, His, Asp	SK	S14		
ClpAP	Su	ClpA	6/12	2	—	N	ClpP	14	Ser, His, Asp	SK	S14		
AAA ⁺ -протеазы и протеолитические комплексы II класса													
ClpXP	Su	ClpX	6/12	1	—	N	ClpP	14	Ser, His, Asp	SK	S14		
PAN/20S	Su	PAN	6/12	1	—	N	β-Su в 20S	14	Thr	PB	T1B		
26S-протеасома	Su	Rpt(1—6) в 19S	6/12	1	—	N	β-Su(1,2,5) в 20S	6 из 14	Thr	PB	T1B		
HslUV	Su	HslU	6/12	1	—	I	HslV	12	Thr	PB	T1B		
FtsH	Dom	FtsH	6	1	—	N	FtsH	6	His, Glu, His, Asp	MA	M41		
LonA	Dom	LonA	6	1	—	N	LonA	6	Ser, Lys	SJ	S16		
LonB	Dom	LonB	6	1	—	I	LonB	6	Ser, Lys	SJ	S16		
LonC	Dom	LonC	6	1	—	I	LonC	6	Ser, Lys	SJ	S16		

Примечание: Su – субъединица; Dom – домен; MD – наличие инсерционного M-домена в D1-модуле; 20S – 20S-протеасома (протеолитические коры архейной (PAN/20S) и эукариотической (26S) протеасом); PAN – Proteasome Activating Nucleotidase (регуляторная составляющая PAN/20S-протеасомы); 19S – регуляторный комплекс 26S-протеасомы; Rpt – Regulatory particle triphosphatase (AAA⁺-АТР-аза).

* Функциональные компоненты в четвертичной структуре протеазы или протеолитического комплекса.

** Количество субъединиц/доменов в ФК.

*** Количество AAA⁺-модулей в субъединице.

Функционально активными формами бактериальных гетероолигомерных АТФ-зависимых протеаз (ClpAP, ClpCP, ClpEP, ClpXP и HslUV) выступают бочкообразные комплексы из состыкованных колец, в которых два центральных пептидазных кольца (гептамерных в случае ClpP или гексамерных в случае HslV) с каталитическими центрами, обращенными внутрь аксиальной полости (деградационная камера), фланкированы с одной или с обеих сторон гексамерными кольцами регуляторных АТФазных субъединиц (ClpA, ClpC, ClpE, ClpX или HslU), выполняющих функции узнавания, разворачивания и транслокации субстрата [56, 57, 70, 74]. Показано, что ассоциация АТФаз ClpA, ClpC, ClpE и ClpX с пептидазой ClpP происходит с участием специальных “стыковочных петель”, локализованных в AAA⁺-модулях шаперонов между остатками sensor-1 NB-доменов и Н-доменами [75]. Гомоолигомерные протеазы Lon и FtsH собираются в бочкообразные структуры из шести идентичных субъединиц.

Аналогично бактериальным AAA⁺-протеазам формируются более сложные мультисубъединич-

ные комплексы протеасом архей (PAN/20S) и эукариот (26S), у которых протеолитические компоненты (20S) представляют тетраэрусные гептамерные кольца из внутренних каталитических β -субъединиц и внешних регуляторных α -субъединиц, одинаковых в 20S-комплексах архей (структурная формула $\alpha_7/\beta_7\beta_7/\alpha_7$) и различающихся в 20S-комплексах эукариот ($\alpha_{1-7}/\beta_{1-7}\beta_{1-7}/\alpha_{1-7}$) [76].

Регуляторные комплексы протеасом (PAN и 19S), обладающие АТФазной активностью, содержат 6 субъединиц у архей и 19 субъединиц у эукариот, при этом основой обеих структур служат гексамерные кольца AAA⁺-белков (соответственно, PAN и Rpt(1–6) – Regulatory particle triphosphatases, табл. 2) [58, 60]. Эти регуляторные комплексы находятся в непосредственном взаимодействии с гептамерами α -субъединиц протеолитических коров протеасом.

На рис. 4 представлен общий принцип функционирования АТФ-зависимых протеаз и мультисубъединичных протеолитических комплексов. Распознавание и связывание белка-мишени (TP – target protein) осуществляется регуляторными

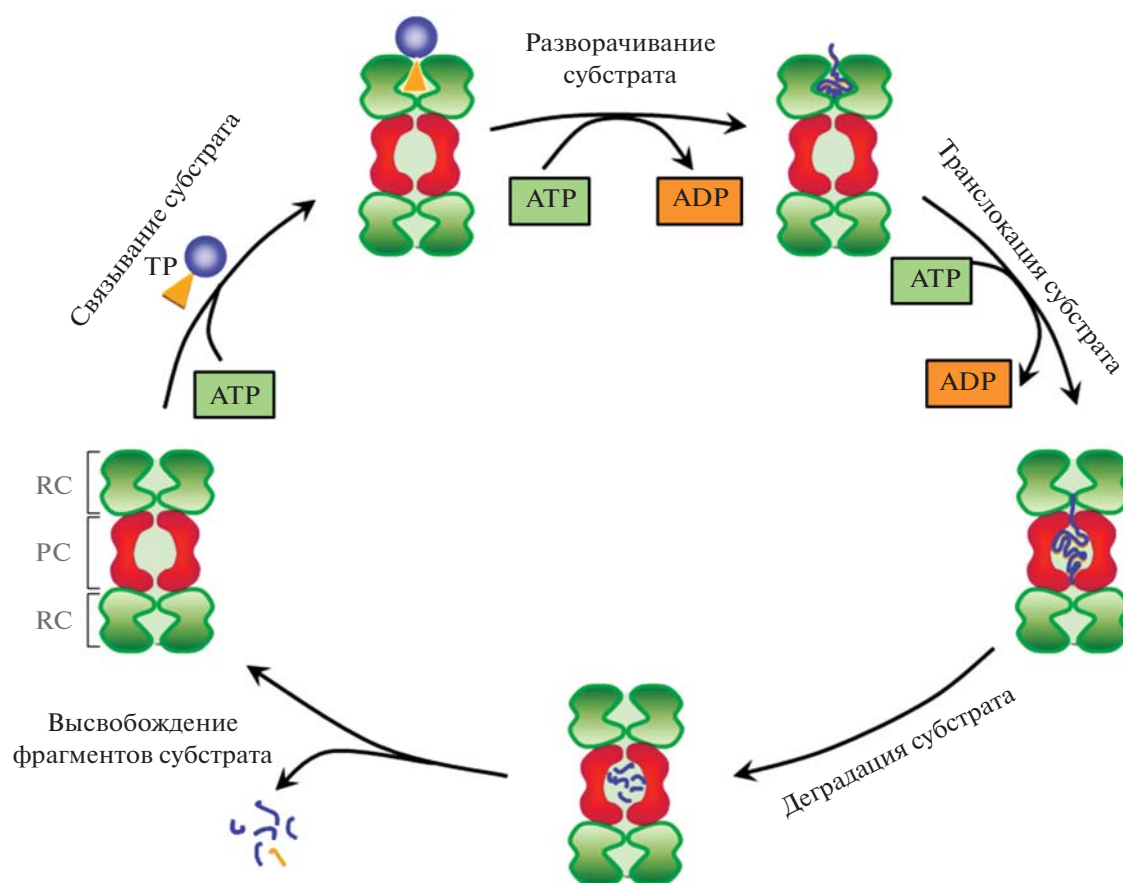


Рис. 4. Схематическое представление механизма АТФ-зависимой деградации белков в клетках бактерий, архей и эукариот (по данным работ Gottesman S. [54] и Bittner et al. [122]). RC – регуляторный АТФазный компонент (Clp(A, C, E, X), HslU, PAN или 19S-комплекс); PC – протеолитический компонент (ClpP, HslV или 20S-протеасома); TP – белок-мишень.

AAA⁺-компонентами (RC — regulatory complexes), локализованными во внешних кольцах активного комплекса фермента. На следующих этапах происходит разворачивание молекулы субстрата и транслокация ее в область протеолитических центров. В деградационной камере, расположенной внутри ферментного комплекса, осуществляется процессивный гидролиз субстрата с последующим высвобождением продуктов. Образовавшиеся олигопептидные фрагменты могут в дальнейшем гидролизироваться АТР-независимыми протеазами до коротких пептидов и, наконец, клеточными аминопептидазами до свободных аминокислот.

Основные характеристики некаталитических экстрадоменов АТР-зависимых протеаз. Специфические для каждого семейства АТР-зависимых протеаз и протеасом экстрадомены их АТР-разных составляющих в большинстве случаев представлены вариabельными “не АТР-разными” N-концевыми (N) доменами, предшествующими AAA⁺-модулям, и реже — вставочными (I) доменами, локализованными внутри NB-доменов между мотивами WA и WB (рис. 2) [41, 56, 67]. Обычно экстрадомены служат местами связывания субстратов [56]. Они выполняют функцию первичного распознавания субстрата-мишени, а также играют важную роль в его разворачивании и/или контролируют доступ мишеней к связывающим центрам, локализованным внутри AAA⁺-модулей. Экстрадомены протеаз LonB и FtsH включают также трансмембранные фрагменты, обеспечивающие взаимодействие ферментов с клеточными мембранами.

Вовлечение в селективный отбор субстратов белков-адаптеров, способных к специфическому взаимодействию как с мишенями, так и с AAA⁺-партнерскими белками, зачастую приводит к модулированию функциональных свойств последних [41, 77]. В качестве примера в табл. 3 представлены адаптерные белки, функционирующие в комплексе с AAA⁺-протеазами в клетках *E. coli* и *Bacillus subtilis*. При этом следует заметить, что обычно LonA-протеазам не требуется никаких адаптеров, и обнаруженный в 2015 г. адаптерный

белок SmiA используется ферментом из *B. subtilis* исключительно для деградации активатора биосинтеза жгутиков SwrA [78]. Для протеаз FtsH и ClpEP из этих же организмов до настоящего времени адаптеров не обнаружено [77].

Большинство белковых адаптеров связываются с N-концевыми экстрадоменами AAA⁺-белков, что обеспечивает оптимальное взаиморасположение AAA⁺-олигомера и “заякоренной” через этот белковый линкер мишени. Обнаружено также, что некоторые адаптерные белки могут влиять на активность AAA⁺-партнеров. При этом сами белки-адаптеры также могут подвергаться регуляции (например, путем взаимодействия с небольшими белками-антиадаптерами и/или посредством фосфорилирования) [77].

N-экстрадомены Clp-шаперонов — АТР-разных компонентов ряда AAA⁺-протеаз. Шапероны Clp-семейств системы контроля качества характеризуются N-концевыми экстрадоменами двух типов. Прежде всего, это α -спирализованные N-домены молекулярных шаперонов ClpB и Hsp104 и родственных им АТР-разных субъединиц (ClpA и ClpC) гетероолигомерных протеаз ClpAP и ClpCP (рис. 2), которые проявляют высокую гомологию на уровне своих первичных и вторичных структур [79, 80]. Эти домены содержат по восемь α -спиралей, формирующих тандемы из двух структурных повторов, каждый из которых включает четыре α -спирали и имеет размер ~70 а.о. Установлено, что N-домены ClpA, ClpB и ClpC выполняют роль регуляторов специфичности своих шаперонов и обеспечивают их взаимодействие с широким набором субстратов-мишеней [80, 81]. Наряду с этим показано, что N-домен ClpA имеет также исключительное значение для образования активного комплекса с ClpP-пептидазой [82].

Для шаперона ClpA выявлен единственный адаптерный белок ClpS (табл. 3), связывание которого с N-доменом приводит к ингибированию деградации известных субстратов ClpAP — SsrA-меченых белков. В то же время комплекс ClpAP/ClpS обнаруживает способность к распознаванию и расщеплению некоторых белков, агрегированных в результате действия теплового шока. Таким образом, взаимодействие ClpS с экстрадоменом модифицирует специфичность ClpA и перенаправляет активное функционирование шаперона на деградацию агрегированных белков [83].

Для ClpC из *B. subtilis* известен целый ряд адаптерных белков (MecA, YpbH, McsB и др.) (табл. 3). Связывание N-домена ClpC с белком-адаптером MecA играет важную роль при деградации большинства субстратов протеолитическим комплексом ClpCP [70]. Показано, что в узнавании и связывании адаптерных белков ClpC-шапероном кроме N-концевого экстрадомена участвует также локализованный в AAA⁺-модуле D1 (рис. 2)

Таблица 3. AAA⁺-протеазы *E. coli* и *B. subtilis* и их адаптерные белки (по данным работ Kirstein et al. [77] и Mukherjee et al. [78])

Протеаза	Источник	Белки-адаптеры
ClpAP	<i>E. coli</i>	ClpS
ClpXP	<i>E. coli</i>	RssB, SspB, UmuD, YjbH
ClpCP	<i>B. subtilis</i>	MecA, YpbH, McsB, ClpS, NblA
LonA	<i>B. subtilis</i>	SmiA

вставочный М'-домен (58 а.о). При этом детали участия адаптерных белков в доставке субстратов к комплексу ClpCP до сих пор остаются неизвестными [71, 77, 80, 84].

Рентгеноструктурные исследования показали, что взаимодействия экстрадоменов ClpA и ClpC с их адаптерами ClpS и MecA носят сходный характер. Оба адаптера используют подобные α -спирали для взаимодействия со структурно подобными областями N-доменов шаперонов, при этом в комплексах шаперон-адаптер формируются одинаковые наборы водородных связей [84].

Вместе с тем ClpC кардинально отличается от других шаперонов семейства Clp/Hsp100, поскольку все виды его активности, включая распознавание и связывание белков-субстратов, гексамеризацию, шапероновую активность, образование функционального комплекса ClpCP и деградацию белковых мишеней, опосредованы обязательным взаимодействием шаперона с адаптерными белками. Выявлен регуляторный механизм, в соответствии с которым в отсутствие белков-субстратов происходит инактивация комплекса ClpCP за счет деградации связанного белка-адаптера [80, 81].

Несмотря на высокое подобие шаперона ClpB и регуляторных шаперонов АТР-зависимых протеаз ClpA и ClpC, адаптерные белки для ClpB до настоящего времени не обнаружены [77]. N-экстрадомены ClpB участвуют во взаимодействии с рядом белковых мишеней, однако их роль в основной функции шаперона — ClpB-опосредованной дезагрегации белков — все еще до конца не изучена. Показано, что ряд вариантов ClpB, несущих точечные мутации в экстрадоме, проявляет пониженную дезагрегационную активность, однако некоторые делеционные формы ClpB из разных источников с полностью удаленным N-доменом сохраняют активность, соизмеримую с активностью полноразмерного белка [16]. Кроме того, существование в *Mycoplasma* sp. гомологов ClpB, лишенных N-домена, подтверждает необязательность наличия N-доменов в ClpB-шаперонах для дезагрегации белков [16]. При этом однозначно установлено, что непосредственное участие в реализации дезагрегационной функции ClpB принимает характеристический для белков ClpB/Hsp104 М-домен, внедренный в AAA⁺-1-модуль шаперона (рис. 2) [85, 86].

Для белков семейства Hsp104 показано, что их N-экстрадомены помимо взаимодействия с белками-мишенями вовлечены также в процессы олигомеризации самих шаперонов [87].

Другой тип N-концевых экстрадоменов Clp-шаперонов представляют гомологичные Zn-связывающие домены (ZBD) протеаз ClpXP и ClpEP, которые относятся к разным классам AAA⁺-белков (рис. 2). При этом можно отметить, что шаперон ClpE проявляет также сходство с ClpC, по-

скольку в своем D1-модуле он содержит вставочный М"-домен (53 а.о), более чем на 60% подобный М'-домеону ClpC (рис. 2). ZBD-экстрадомены ClpX и ClpE имеют размеры ~60 а.о. и включают по четыре остатка цистеина, координирующих атом Zn [88].

Показано, что ZBD-домен ClpX *E. coli* отвечает за узнавание некоторых субстратов (в частности, белков λ O и MuA) и, кроме того, связывает адаптерный SspB-белок (табл. 3), направляющий субстраты к осевому каналу ClpX для разворачивания [88]. О белке ClpE известно, что он участвует в процессе дезагрегации и в последующей деградации агрегированных белков, а его N-концевой экстрадомен необходим для проявления базовой АТРазной активности шаперона *in vitro* [70, 89].

На примере ClpX установлено, что индивидуальные ZBD-экстрадомены образуют стабильные димеры, в то время как в кольцевых гексамерах полноразмерных шаперонов шесть ZBD-доменов формируют тримеры димеров, локализованные на поверхности гексамерных колец AAA⁺-модулей ClpX [88].

N-концевые экстрадомены AAA⁺-АТРаз протеасом. AAA⁺-регуляторные комплексы, активирующие протеолитические 20S-коры протеасом, в случае архей сформированы гомогексамерами протеасомоактивирующей нуклеотидазы PAN, а в случае эукариот представлены 19S-ансамблями, состоящими из 19 субъединиц, шесть неидентичных AAA⁺-белков которых (Rpt(1–6), табл. 2) образуют кольцевые гексамерные “основания”, непосредственно взаимодействующие с 20S-корами [90–92]. Топологически подобные белки PAN и Rpt, как и другие AAA⁺-АТРазы, включают N-концевые экстрадомены (PAN-N и Rpt-N соответственно), которые участвуют в формировании гексамеров, в узнавании и связывании белковых мишеней и совместно с собственными AAA⁺-модулями превращают химическую энергию в механическую работу.

Экстрадомены PAN-N и Rpt-N начинаются с α -спиральных сегментов, за которыми следуют глобулярные β -структурированные C-концевые участки, формирующие олигосахарид-связывающий (ОВ) фолд [91, 92]. Архитектурно экстрадомены PAN-N и Rpt-N представляют собой тримеры димеров, в которых на гексамерных кольцах ОВ-фрагментов располагаются три СС-участка, образованные парами N-концевых α -спиральных сегментов соседствующих субъединиц [91, 92]. Эти структуры через короткие линкеры соединяются с гексамерными кольцами AAA⁺-модулей PAN и Rpt, имеющими каноническую укладку AAA⁺-АТРаз [91].

В функционально активных протеасомах, включающих и регуляторные, и протеолитиче-

ские компоненты, кольца AAA⁺-модулей ассоциируются с протеолитическим кором 20S и управляют АТР-зависимым разворачиванием белка-субстрата, тогда как дистальные комплексы экстрадоменов образуют входные отверстия каналов транслокации субстрата [93].

Инсерционные экстрадомены HslUV-протеаз. Характерная особенность АТР-зависимого компонента гетероолигомерной протеазы HslUV — отсутствие N-концевого домена. Вставочные α -спирализованные экстрадомены (I-домены) HslU размером ~130 а.о., формирующие в кольцевом олигомере воронкообразную полость, расположены в NB-домене шаперона вслед за спиралью α 2 и в непосредственной близости от мотива WB (рис. 3) [94, 95]. Гексамер, образованный I-доменами, обеспечивает отбор полипептидных субстратов для деградации, способствует транслокации субстратов в протеолитическую камеру HslUV-комплекса, а также участвует в гидролизе АТР и деградации белковых мишеней [94, 95].

N-экстрадомены FtsH-протеаз. FtsH — единственная мембраносвязанная AAA⁺-протеаза бактерий. Функционально активной формой фермента, нацеленного на деградацию мембраносвязанных белков, служит кольцевой гомогексамер [96]. N-экстрадомены FtsH-протеаз содержат трансмембранные сегменты, сформированные двумя α -спиралями [96, 97]. Показано, что N-домен влияет на олигомеризацию и стабильность FtsH [98]. Белковые адаптеры для FtsH-протеаз неизвестны, однако существует целый набор белковых модуляторов и ассоциированных факторов (HflK, HflC, HflD, MgtR, SpoVM), которые участвуют в функционировании ферментов [90]. Аналоги FtsH обнаружены в митохондриях и хлоропластах эукариот. Установлено высокое подобие N-экстрадоменов бактериальных и эукариотических FtsH-протеаз [97]. Обнаружена также особая роль FtsH как единственной AAA⁺-протеазы, имеющей критическое значение для выживаемости *E. coli* [99].

Три типа экстрадоменов протеаз семейства Lon. Lon-протеазы — это единственное семейство АТР-зависимых протеаз, которое в системе контроля качества клеточных белков представлено тремя подсемействами (LonA, LonB и LonC, см. далее подраздел “Общая характеристика семейства Lon-протеаз. Подсемейства Lon”), имеющими сходные AAA⁺-модули и протеазные домены, но кардинально различающимися строением и локализацией своих экстрадоменов (рис. 2 и 5) [100]. Согласно современной концепции, представляющей AAA⁺-модуль пролонгированной N-концевая область LonA-протеаз в действительности сформирована двумя доменами [101] — собственно N-концевым β -структурированным экстрадоменом (N) [102, 103] и следующим за ним “вста-

вочным” α -спирализованным доменом [101, 104]. При этом вставочный домен включает олигопептидный фрагмент (~100 а.о.) с CC-конформацией и носит название HI(CC) (helical inserted with CC-fragment — инсерционный спирализованный с CC-фрагментом) домен [101, 105].

Ферменты подсемейств LonB и LonC, лишенные N-экстрадоменов, содержат разные по размеру инсерционные экстрадомены (I и I*), включающие, соответственно, 124–140 и 185–191 а.о., которые внедрены, как и у HslUV, внутрь NB-доменов их собственных AAA⁺-модулей (рис. 5) [73, 100, 106–108]. Однако, в отличие от HslUV, I-домены Lon-протеаз локализованы вблизи мотива WA, непосредственно после спиралей α 1 (рис. 3). Особенностью экстрадоменов LonB-протеаз служит наличие включенных в их последовательности трансмембранных сегментов (ТМ).

Сходство и различия экстрадоменов AAA⁺-белков СКК. Приведенные выше данные по экстрадоменам AAA⁺-белков — представителей системы контроля качества клеточного протеома — показывают, что эти некаталитические фрагменты AAA⁺-протеаз и протеолитических комплексов разнообразны по структуре: они могут быть полностью α -спирализованными (как N-домены ClpA, ClpB и ClpC, а также I-домены HslU и LonC), могут иметь α/β -структуру (ZBD-домены ClpX и ClpE), могут представлять β -структурный фолд (ОВ) с включением N-концевых CC-фрагментов (N-домены AAA⁺-АТРаз регуляторных комплексов эукариотических и архейных протеасом), и, наконец, их последовательности могут содержать спиральные фрагменты, обеспечивающие взаимодействие с клеточными мембранами (N-концевой домен FtsH и I-домен LonB-протеаз). В настоящее время для большинства экстрадоменов AAA⁺-белков СКК получены рентгеноструктурные данные (в том числе для ClpA *E. coli* PDB: 1K6K; ClpB *E. coli* PDB: 1KHY; ClpB *Thermus thermophilus* PDB: 1QVR; ClpC *B. subtilis* PDB: 2Y1Q; ClpX *E. coli* PDB: 2DS7; Hsp104 *S. cerevisiae* PDB: 5U2U; Hsp104 *Candida albicans* PDB: 5U2L; HslU *E. coli* PDB: 1YYF; HslU *Haemophilus influenzae* PDB: 1G41; FtsH *E. coli* PDB: 4V0B; FtsH *Thermotoga maritima* PDB: 4M8A и др.) и выявлена их роль в связывании белков-мишеней и/или белковых адаптеров.

Практически все экстрадомены AAA⁺-белков СКК объединены одним общим свойством — их размеры не превышают 150–190 а.о. В этом отношении протеазы подсемейства LonA занимают особое место, поскольку только у них некаталитическая N-концевая область включает от 300 до более чем 400 аминокислот и состоит из двух структурно независимых доменов — N и HI(CC) (рис. 2) [100, 101]. При этом кристаллическая структура определена только для N-домена [102–

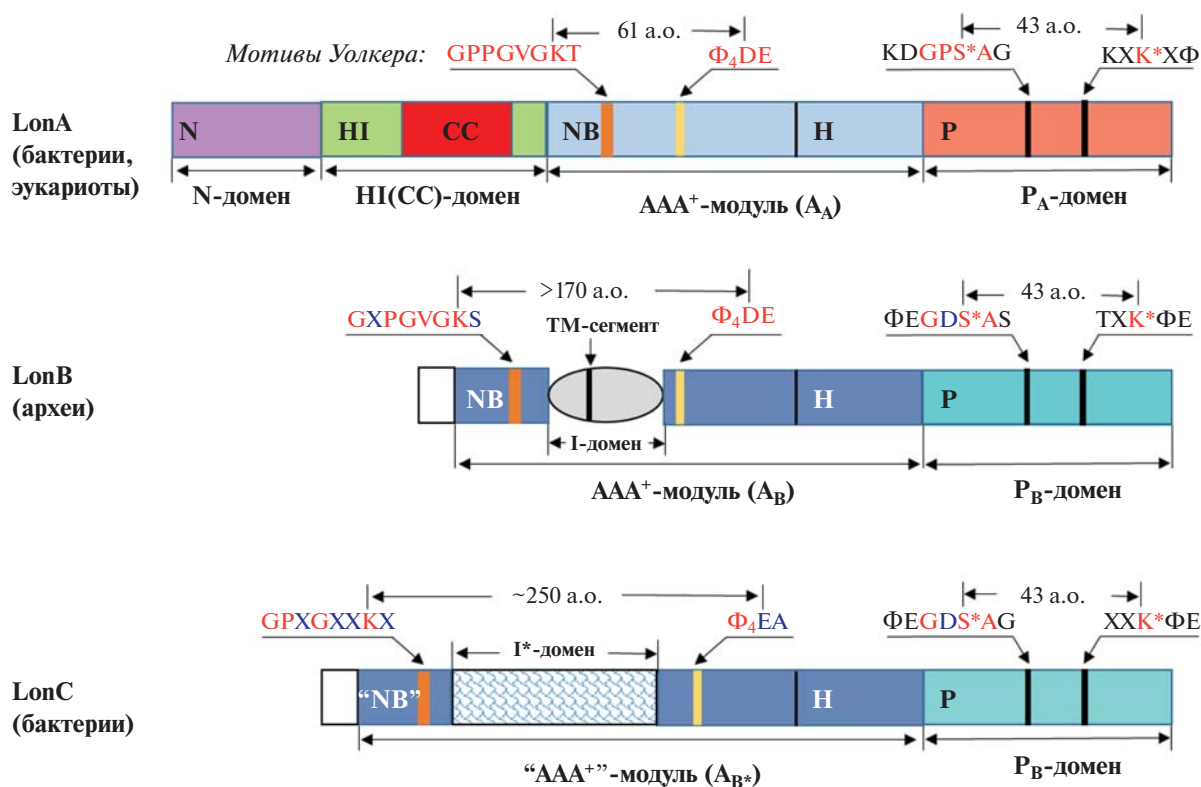


Рис. 5. Доменная организация и консерсусные элементы Lon-протеаз различных подсемейств. S* и K* — каталитически активные остатки протеолитического центра, Φ — остаток гидрофобной аминокислоты, X — остаток любой аминокислоты, P_A и P_B — протеазные домены А-типа (коралловый) и В-типа (бирюзовый), A_A, A_B и A_{B*} — AAA⁺-модули соответственно А-типа (голубой), В-типа и В*-типа “вырожденный” (синие), NB — нуклеотид-связывающие домены, Н — α-спирализованные домены. Экстрадомены ферментов включают: N-домен (фиолетовый) и HI(CC) — вставочный α-спирализованный домен (зеленый) с участком coiled-coil (CC) (красный) у протеаз LonA, I — вставочный домен с трансмембранным (TM) сегментом (серый) у LonB и I* — вставочный α-спирализованный домен (заштрихован) у LonC; консервативные фрагменты показаны красным цветом; замены аминокислот в консервативных фрагментах выделены синим цветом.

104], а пространственная укладка инсерционного HI(CC)-домена остается невыясненной до сих пор. До последнего времени участие каждого из этих доменов в функционировании полноразмерного фермента также не было охарактеризовано в полной мере.

Вместе с тем LonA-протеазы играют ключевую роль в функционировании системы контроля качества в бактериях и эукариотах. Так, известно, что в клетках *E. coli* именно LonA-протеаза обеспечивает >50% протеолиза аномальных белков [109], а у эукариот LonA-протеазы — ведущие ферменты, расщепляющие окисленные белки митохондриального матрикса. Установлено, что многие патологии (в частности, нейродегенеративные нарушения и развитие ряда онкологических заболеваний) сопровождаются изменениями содержания LonA-протеазы в клетках [110–113]. Сведения об участии LonA-протеаз в патологических процессах и о возможности их применения в медицинских целях широко представлены в современной литературе (обзоры [114–118]). Су-

щественная биологическая роль LonA-протеаз определяет важность их структурно-функционального исследования.

Lon-ПРОТЕАЗЫ КАК ОСОБОЕ СЕМЕЙСТВО В СИСТЕМЕ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА КЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ

Общая характеристика семейства Lon. Подсемейства Lon-протеаз

Согласно современной классификации MEROPS [119], семейство Lon-протеаз S16 клана SJ формируется, главным образом, подсемействами А, В и С (табл. 2). Lon-протеаза из *E. coli* (*EcLon*), относящаяся к наиболее представительному подсемейству LonA, исторически была первой экспериментально обнаруженной АТР-зависимой пептидгидролазой (1981 г.) [120], и до настоящего времени она остается основной моделью при изучении ферментов семейства Lon.

К 2004 г. семейство Lon-протеаз насчитывало уже более 100 ферментов из различных источников. Сравнительный анализ их первичных структур позволил выделить в общем пуле два подсемейства — крупное LonA (80 ферментов) и менее репрезентативное LonB [100] (рис. 5). На текущий момент в базе данных MEROPS [119] насчитывается ~2300 LonA-протеаз и >200 LonB-ферментов. Наряду с рассмотренными выше различиями в экстрадоменах, протеазы LonA и LonB характеризуются также разными типами протеолитических центров: окружение каталитически активных остатков в подсемействах представлено фрагментами **KDGPS*AG** и **KXK*XF** (у LonA) или **ФEGDS*AS** и **ТХК*ФЕ** (у LonB), где **S*** и **K*** — каталитические остатки серина и лизина, в обоих случаях отстоящие друг от друга на 43 а.о., **X** — любая, а **Ф** — гидрофобная аминокислота (жирным шрифтом выделены консервативные остатки, подчеркнуты различные по природе остатки) (рис. 5). Помимо этого, присутствуют отличия и в аминокислотных сегментах AAA⁺-модулей, формирующих мотивы Уолкера и их окружение: так, мотивы **WA** представлены пептидами **GPPGVGKT** (LonA) и **GXPVGKKS** (LonB), а подобные мотивы **WB** (**Ф₄DE**) фланкированы различающимися пептидами: у LonA это **NP** и **IDK**, а у LonB — **KG** и **INT** [100].

Как упоминалось выше, LonA-протеазы преимущественно обнаруживаются в прокариотах (цитозольные ферменты) и эукариотах (ферменты митохондрий, хлоропластов и пероксисом). Между тем, несколько протеаз LonA-типа идентифицировано также у отдельных представителей архей (в том числе *Methanosarcina* sp., *Methanobacterium formicicum* и *Methanlobus psychrophilus*) [119].

Что касается протеаз LonB, то они представлены в основном в археобактериях. Однако в течение последнего десятилетия протеазы с LonB-типом протеолитического центра (окружение каталитических остатков: **ФEGDS*AG** и **ХХК*ФЕ**) обнаружены и у ряда термофильных бактерий (в частности, *Marinithermus hydrothermalis*, *Meiothermus taiwanensis*, *T. thermophilus* и др.). В своих АТРазных компонентах эти ферменты также проявляют подобие с LonB-протеазами. Однако они не способны к гидролизу АТР из-за вырожденности АТРазных центров вследствие замен существенных консервативных остатков в мотивах Уолкера и их окружении: **GPXGXXKX** (**WA**) и **GGФ₄EAXXФ** (**WB**), а также на участках sensor-1 и sensor-2. Еще одной отличительной характеристикой новой группы ферментов служит наличие дополнительного по сравнению с LonB-протеазами α-спирализованного фрагмента размером 90–91 а.о. в экстрадомене, локализованном внутри потенциального AAA⁺-модуля (рис. 5) [100, 107, 121]. Несмотря на то что такие ферменты могут только

связывать, но не гидролизовать АТР, они тоже проявляют способность к селективной деградации развернутых белковых субстратов, но по АТР-независимому механизму [121]. К настоящему времени именно это сообщество ферментов оформилось в немногочисленное (в пределах 10 представителей) третье подсемейство Lon-протеаз — LonC (рис. 5) [119].

Современные исследования протеаз семейства Lon направлены, прежде всего, на получение данных о пространственных структурах этих ферментов и механизмах их функционирования. При этом семейство Lon-протеаз достаточно полно охарактеризовано в части АТРазных и пептидгидролазных свойств представителей всех трех подсемейств [108, 122–127]. Вместе с тем вследствие особенностей организации некаталитической области структурно-функциональная характеристика самого крупного подсемейства LonA в целом остается недостаточно изученной, и для ряда научных групп она служит программой продолжающихся исследований.

LonA-протеазы — уникальный подкласс AAA⁺-белков

Индивидуальные субъединицы гомоолигомерных LonA-протеаз образованы пятью доменами (рис. 5). Функциональными выступают протеазный C-концевой домен (**P**) и центральные нуклеотид-связывающий (**NB**) и α-спирализованный (**H**) домены, которые формируют АТРазный AAA⁺-модуль. В неординарной для AAA⁺-белков СКК некаталитической N-концевой области ферментов локализованы два домена: N-концевой (**N**, включающий 110–130 а.о. у бактериальных ферментов и 165–220 а.о. у эукариотических) и инсерционный (**HI(CC)**, 178–186 а.о. у ферментов из любых источников).

Поскольку пространственные структуры полноразмерных LonA-протеаз до самого последнего времени не были известны, структурные сведения о представителях подсемейства ограничивались преимущественно 3D-данными для ряда фрагментов ферментов из различных источников: *E. coli*, *B. subtilis*, *Brevibacillus thermoruber*, *M. taiwanensis*, *Mycobacterium avium* и мозга человека (*EcLon*, *BsLon*, *BtLon*, *MtLon*, *MaLon* и *HumLon* соответственно). Эти данные полностью согласуются с предсказанными вторичными структурами LonA-протеаз и дают представление о трехмерных структурах четырех из пяти их доменов — **N**, **NB**, **H** и **P** [102–105, 128–135].

Результаты рентгеноструктурного анализа показали, что структуры доменов **NB** и **H**, составляющих AAA⁺-модуль LonA-протеаз, топологически подобны соответствующим фрагментам классических AAA⁺-белков (в частности, един-

ственным D-модулям протеаз ClpXP и HslUV, а также D2-модулям шаперонов ClpB/Hsp104 и регуляторных компонентов АТФ-зависимых протеаз ClpAP, ClpCP и ClpEP) [63, 67, 122].

Отличительными именно для LonA-протеаз оказались структуры их N-концевых и протеазных доменов. Установлено, что β -структурированные N-домены бактериальных LonA-протеаз, состоящие из семи β -тяжей и двух α -спиральных фрагментов, обнаруживают выраженное сходство с N-доменом гипотетического белка BPP1347 из *Bordetella parapertussis* [102], который относится к группе РНК-связывающих белков, обладающих PUA-подобной архитектурой [136]. N-домены эукариотических LonA-протеаз проявляют высокое подобие с N-доменами бактериальных ферментов и при этом в большинстве своем содержат крупные вставочные фрагменты размером до 100 а.о. в шпильке между шестым и седьмым β -тяжами [105].

Характеристический фолд Р-доменов, который отличает LonA-протеазы от других серин-лизиновых пептидгидролаз (в частности, от ферментов семейств S24 и S26 клана SF) [128], в 2004 г. послужил основой для выведения всего семейства Lon (S16) в индивидуальный структурный клан SJ в базе данных MEROPS [119].

И лишь упаковка индивидуального HI(CC)-домена, образованного восемью α -спиралями

($\alpha 3$ – $\alpha 10$ в субъединице LonA), четыре из которых ($\alpha 6$ – $\alpha 9$) по предсказанию могут формировать СС-участок в протомере фермента [101], до сих пор не определена. Вместе с тем известны кристаллические структуры некоторых укороченных бактериальных LonA-протеаз, которые наряду с одним или несколькими доменами фермента включают либо пять N-концевых спиралей HI(CC)-домена (форма *EcLon* (1–245) [104]), либо три его C-концевые спирали (формы *EcLon* (235–584), *BsLon* (240–774) и *MtLon* (242–793) [103, 105, 131]). Рассмотрение всех известных структурных фрагментов LonA-протеаз, полученных с помощью рентгеновской кристаллографии, показывает, что на настоящем этапе только для *EcLon* существует набор 3D-структур тех участков фермента, которые в совокупности покрывают его полную аминокислотную последовательность (рис. 6) [104, 105, 128, 129]. Это позволяет считать *EcLon*-протеазу не только базовым ферментом, но и структурной моделью для общего пула LonA-протеаз.

Различие функций доменов, формирующих N-концевую область LonA-протеаз. Однозначное подтверждение двухдоменной организации N-концевой области LonA-протеаз было получено экспериментально на примере *EcLon*-протеазы путем сравнительного исследования функционирования фермента и его модифицированных форм. При этом были использованы рекомби-

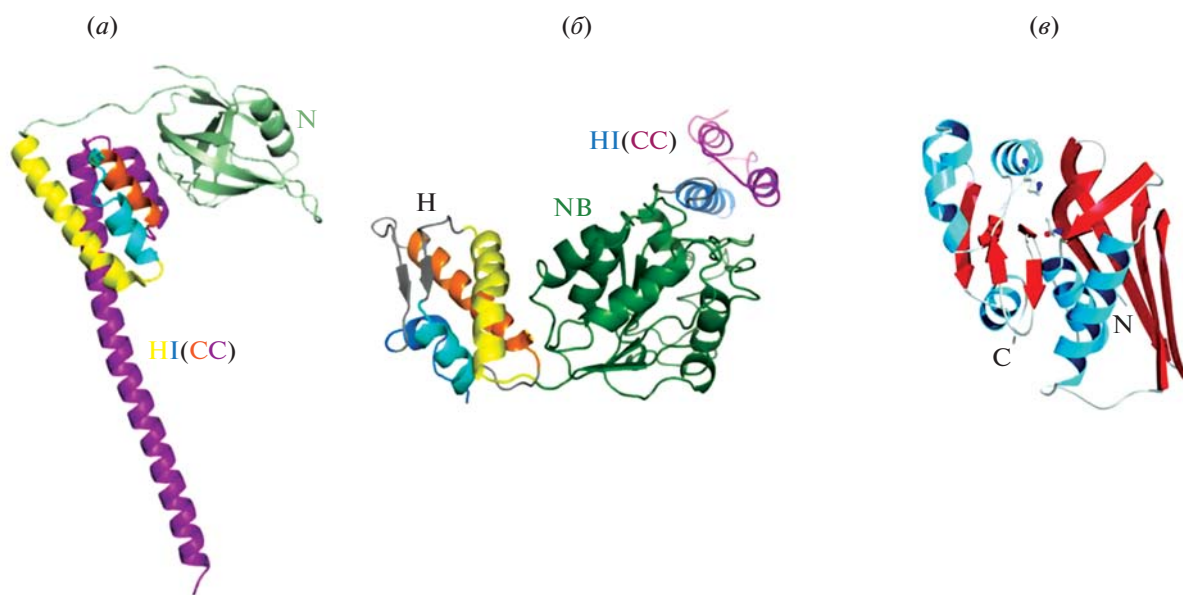


Рис. 6. Кристаллические структуры фрагментов *EcLon*-протеазы: (1–245) (а), (235–584) (б) и (585–784) (в) (по данным работ Li et al. [104], Rotanova et al. [105] и Botos et al. [128]). (а) – N-домен (M^1 – Y^{116}) показан оливковым цветом, спирали HI(CC)-домена показаны желтым ($\alpha 3$), голубым ($\alpha 4$), оранжевым ($\alpha 5$) и фиолетовым ($\alpha 6$ и $\alpha 7$, СС-участок) цветами; (б) – спирали HI(CC)-домена показаны фиолетовым ($\alpha 8$, $\alpha 9$, СС-участок) и темно-синим ($\alpha 10$) цветами, NB-домен – зеленым, спирали Н-домена окрашены так же, как спирали $\alpha(3$ – $5)$ и $\alpha 10$ HI(CC)-домена; (в) – спирали Р-домена показаны синим цветом, β -тяжи – красным.

нантная форма *EcLon*, ее укороченные модификации, не содержащие либо консервативной части N-домена (*Lon-d106*) [137], либо 172 N-концевых остатков вплоть до начала CC-участка (*Lon-d172*) [138], делеционные формы, лишенные полного HI(CC)-домена или его CC-участка (*Lon-dHI(CC)* и *Lon-d(CC)* соответственно [139, 140]), точечные мутанты с заменами потенциально важных остатков, локализованных в разных участках HI(CC)-домена (*Lon-R164A*, *Lon-R192A* и *Lon-Y294A*) [141], и тройной мутант *Lon^{EKR}*, несущий замены трех заряженных поверхностных остатков (E34, K35 и R38) в N-доме фермента [142] (рис. 7).

Изучение АТРазной, пептидазной и протеолитической активностей, а также аутолитического расщепления *EcLon*-протеазы и ее модифицированных форм, проведенное как в базовых условиях, так и при влиянии эффикторов (белковые субстраты в случае гидролиза АТР и нуклеотиды или их комплексы с ионами Mg^{2+} в случае других типов активности) показало, что оба домена N-концевой области важны для функционирования индивидуальных каталитических центров *LonA*-протеаз — АТРазного и пептидазного, а также для осуществления аллостерических взаимодействий между ними. При этом ключевую роль в реализа-

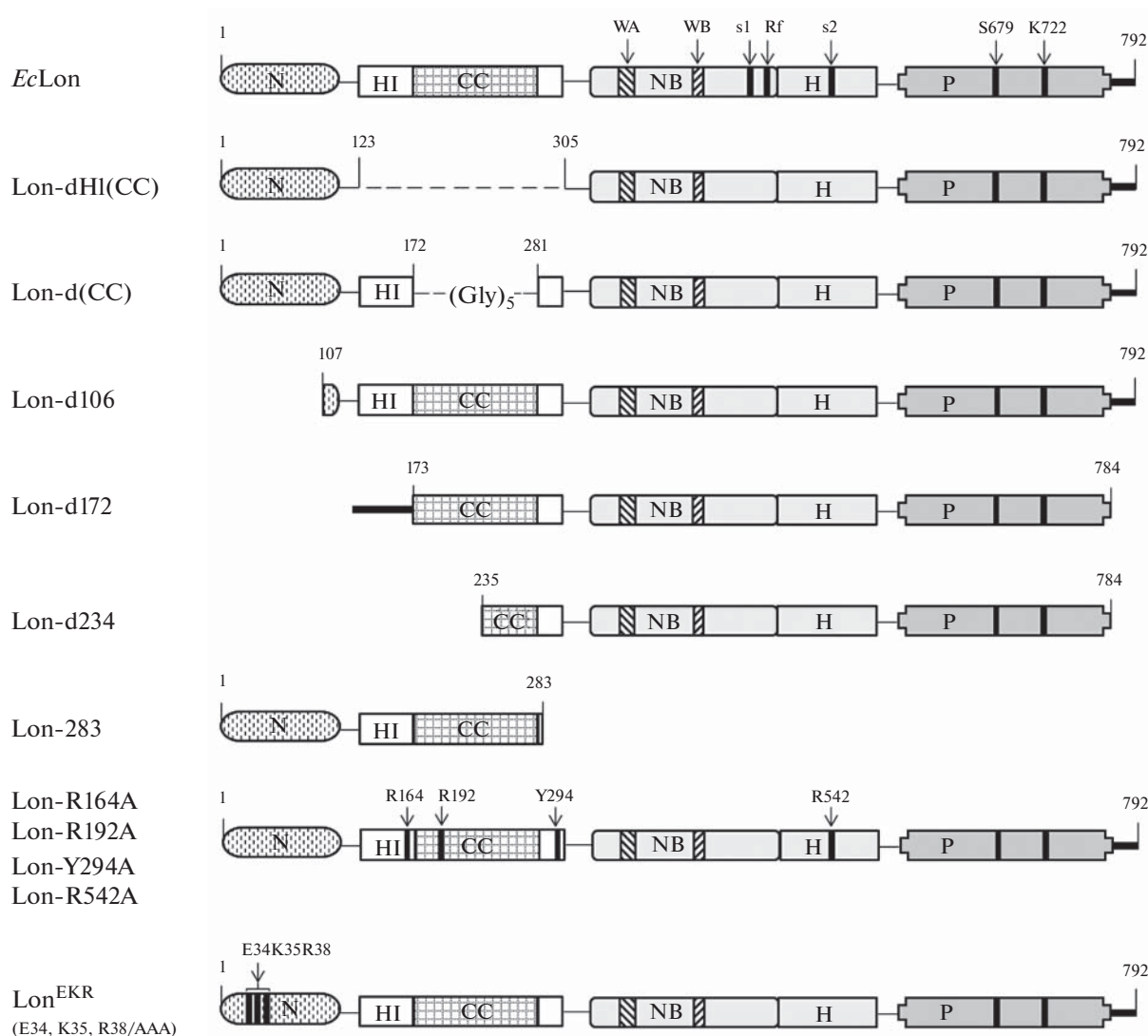


Рис. 7. Модифицированные и мутантные формы *EcLon*-протеазы, использованные для изучения вклада некаталитической N-концевой области в функционирование фермента. Консервативные элементы: WA и WB — мотивы Уолкера, s1 и s2 — сенсорные остатки, Rf — остаток “аргининовый палец”, Ser679 и Lys722 — каталитические остатки. Показаны гексагистициновые тэги (Н6-тэги) на C-конце *EcLon* и ее различных форм (в форме *Lon-d172* Н6-тэг локализован на N-конце белка).

ции уникального процессивного механизма гидролиза белкового субстрата играет инсерционный HI(CC)-домен, который вовлечен в формирование функционально активной гексамерной структуры фермента и во взаимодействия *EcLon*-протеазы с нуклеотидами и белковыми субстратами. В отношении N-домена сделано заключение о том, что его основная функция — обеспечение конформационной стабильности *EcLon*-протеазы в классических условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТФ.

Структурное сходство между LonA-протеазами и ClpB-шаперонами. Для получения представления о структуре инсерционного HI(CC)-домена в составе протомера фермента были предприняты попытки совмещения фрагментов *EcLon*-протеазы, представленных на рис. 6. Однако такая задача оказалась невыполнимой вследствие чрезвычайной гибкости региона, формирующего HI(CC)-домен. Тем не менее путем сравнительного анализа кристаллических структур форм *EcLon*, содержащих фрагменты HI(CC)-домена (рис. 6а, 6б), и АТФ-разных модулей ClpB-шаперонов (рис. 8а) было показано, что LonA-протеазы могут представлять собой новый необычный подкласс AAA⁺-белков [105].

Основанием для такого анализа послужило обнаруженное сходство [100, 101, 105] первичных и вторичных структур HI(CC)-доменов LonA-протеаз и H1-доменов D1-модулей шаперонов ClpB с

внедренными в них пропеллерообразными M-доменами, обладающими CC-структурой (H1(M)-фрагмент на рис. 2). Общий специфический признак сопоставляемых фрагментов — наличие “длинных” α-спиралей (55 а.о. у LonA-протеаз и 58 а.о. у ClpB-шаперонов, рис. 6а и 8а соответственно), степень подобия которых превышает 50% при общей степени сходства CC-сегментов ~36%.

Было проведено сопоставление α-спирализованной составляющей D1-модуля ClpB-шаперона *T. thermophilus* (*TtClpB*, домены H1 и M на рис. 8б) и фрагментов *EcLon*, потенциально формирующих HI(CC)-домен фермента (рис. 8в и 8г — участки, объединенные серым фоном). Структурная эквивалентность “длинных” спиралей (L2 и α7), совпадение общего количества спиралей в CC-сегментах (L1–L4 и α6–α9) и возможное сходство их топологического расположения с учетом различий в размерах малых спиралей (рис. 8б–8г) позволили выдвинуть гипотезу о том, что архитектура вставочного HI(CC)-домена LonA-протеаз может быть подобной архитектуре H1(M)-фрагмента ClpB-шаперонов [100, 101, 105].

Данные в поддержку этого предположения были получены при сравнительном изучении расположения ключевой консервативной петли pore loop-1 (GYVG) AAA⁺-модулей в структурах LonA-протеаз и ClpB-шаперонов, проведенном путем наложения соответствующих структурных фрагментов NB-доменов LonA-протеаз на фраг-

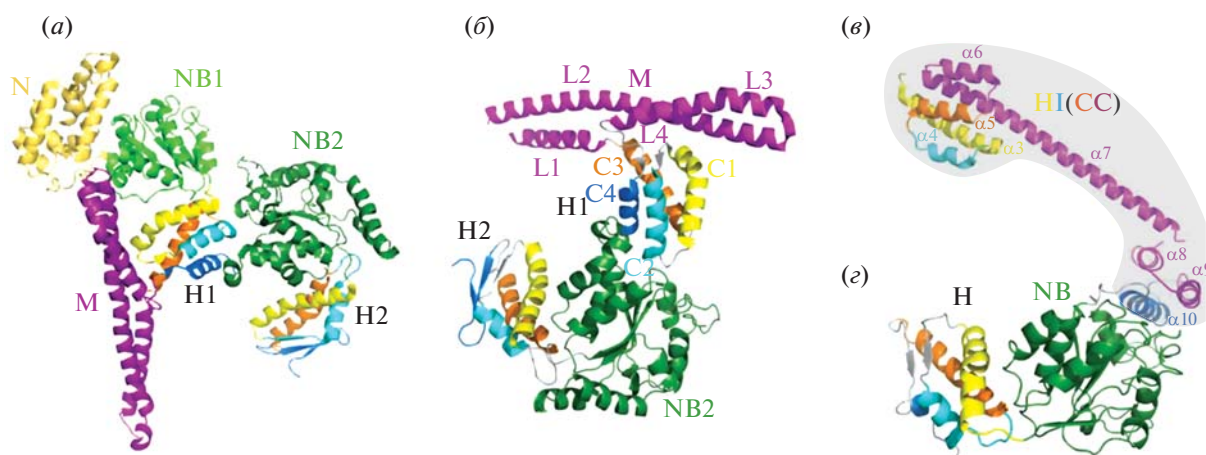


Рис. 8. Кристаллическая структура шаперона *TtClpB* (а) и сопоставление фрагмента *TtClpB* ($E^{331}-A^{854}$) (б) с фрагментами *EcLon*-протеазы ($E^{124}-D^{245}$) (в) и ($A^{247}-F^{584}$) (з), потенциально формирующими HI(CC)-домен (по данным работ Lee et al. [49] и Rotanova et al. [105]). (а) — Мономер *TtClpB*: N-домен показан золотистым цветом, NB1-домен — светло-зеленым, NB2-домен — темно-зеленым, вставочный M-домен — фиолетовым цветом; (б) — *TtClpB*, лишенный N- и NB1-доменов ($E^{331}-A^{854}$); (в) — фрагмент HI(CC)-домена *EcLon*-протеазы ($E^{124}-D^{245}$); (з) — фрагмент *EcLon* ($A^{235}-F^{584}$), включающий C-концевую часть HI(CC)-домена и AAA⁺-модуль (домены NB и H). Спирали доменов H1, H2 (*TtClpB*), HI(CC) и H (*EcLon*) окрашены как на рис. 6. Серым фоном объединены фрагменты *EcLon*, составляющие HI(CC)-домен.

менты NB1- и NB2-доменов шаперонов ClpB, а также топологически подобных им шаперонов ClpA, у которых отсутствует вставочный M-домен. При этом было установлено, что ориентация GYVG-петли в LonA-протеазах кардинально отличается от ее положения в NB1-доменах ClpB и в обоих NB-доменах ClpA (рис. 9а, 9б и 9г), но однозначно и безусловно совпадает с ее расположением в NB2-доменах ClpB (рис. 9б) [105]. Полученные результаты позволили сделать заключение о том, что и предстоящие NB-доменам α -спирализованные H1(CC)-домены LonA-протеаз, и H1(M)-фрагмен-

ты ClpB-шаперонов также могут проявлять определенное топологическое сходство.

Совокупные данные рентгеноструктурного анализа представляют достаточно обоснованные аргументы в пользу справедливости гипотезы о том, что инсерционный H1(CC)-домен можно рассматривать в качестве α -спирализованного компонента гипотетического добавочного AAA⁺-модуля, который мог локализоваться в LonA-протеазах подобно D1-модулю шаперонов ClpB (рис. 2), однако утратил свой нуклеотид-связывающий домен. На этом основании Rotanova et al. [105] предлагают признать протеазы подсемей-

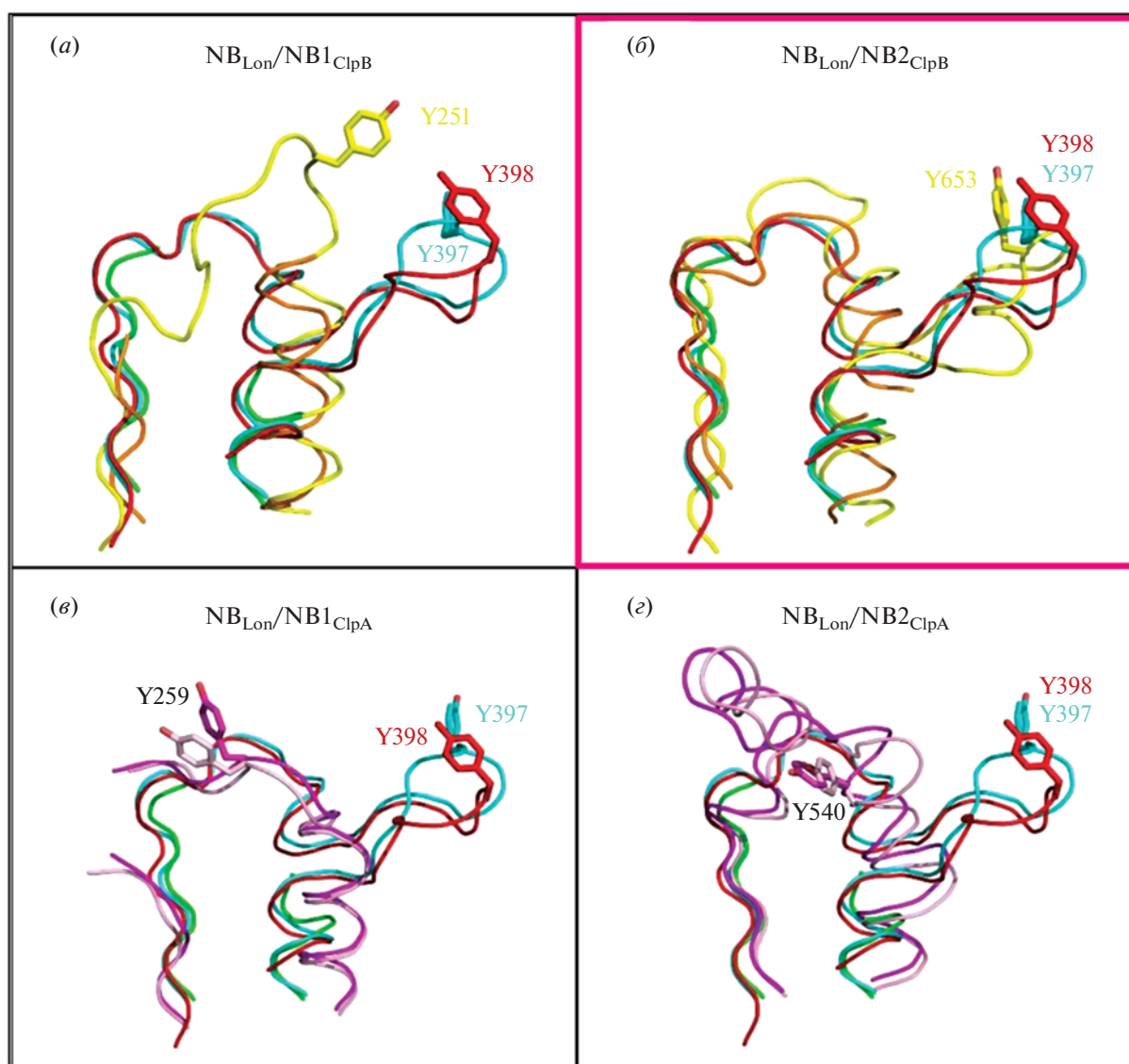


Рис. 9. Сопоставление фрагментов, включающих аксиальные петли pore loop-1 (GYVG), в кристаллических структурах NB-доменов LonA-протеаз и NB1(NB2)-доменов шаперонов ClpA и ClpB (по данным работы Rotanova et al. [105]). Цвета фрагментов последовательностей: *EcLon* – красный, *BsLon* – ярко-зеленый, *MtLon* – голубой, *EcClpB* – желтый, *TiClpB* – оранжевый, *EcClpA-1* – розовый и *EcClpA-2* – пурпурный.

ства LonA особым, ранее неохарактеризованным подклассом AAA⁺-белков.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЯХ И МЕХАНИЗМАХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ LonA-ПРОТЕАЗ И ДРУГИХ AAA⁺-БЕЛКОВ СИСТЕМЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

В самое последнее время наметился значительный прогресс в определении трехмерных структур и выявлении особенностей фундаментальных механизмов функционирования AAA⁺-белков — этих динамических молекулярных машин, которые обеспечивают структурную базу для осуществления транслокации белковых субстратов. Основой достигнутых успехов служит широкое использование криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) высокого разрешения, позволяющей визуализировать как конформационные превращения собственно AAA⁺-АТРаз, так и отдельные этапы фермент-субстратных взаимодействий у AAA⁺-протеаз системы контроля качества белков, включающие распознавание и связывание субстратов, их транслокацию и последующую деградацию. Новейшие достижения в этой области и перспективные направления новых ис-

следований были представлены и подробно освещены на Втором симпозиуме по AAA⁺-белкам (Keystone, 2020 [143]).

Спиральная организация гексамеров AAA⁺-белков — базовое условие транслокации белковых мишеней/субстратов

Представление об общей архитектуре AAA⁺-белков как циклических гексамеров было получено в результате их рентгеновской кристаллографии. При этом в ряде случаев AAA⁺-белки обнаруживались в виде открытых гексамерных колец или спиралевидных комплексов, что свидетельствовало о возможности больших конформационных изменений у этих ферментов [144]. Вместе с тем вопросы о взаимодействии AAA⁺-белков со своими субстратами и о путях сопряжения АТРазной и транслокационной функций долгое время оставались неизученными.

Прорывным исследованием в этом отношении оказалась работа 2013 г. [145], в которой при помощи крио-ЭМ впервые было показано, что взаиморасположение шести субъединиц (Rpt1—Rpt6) регуляторного 19S-комплекса дрожжевой 26S-протеасомы, связанной с субстратом, представляет тип правосторонней “винтовой лестни-

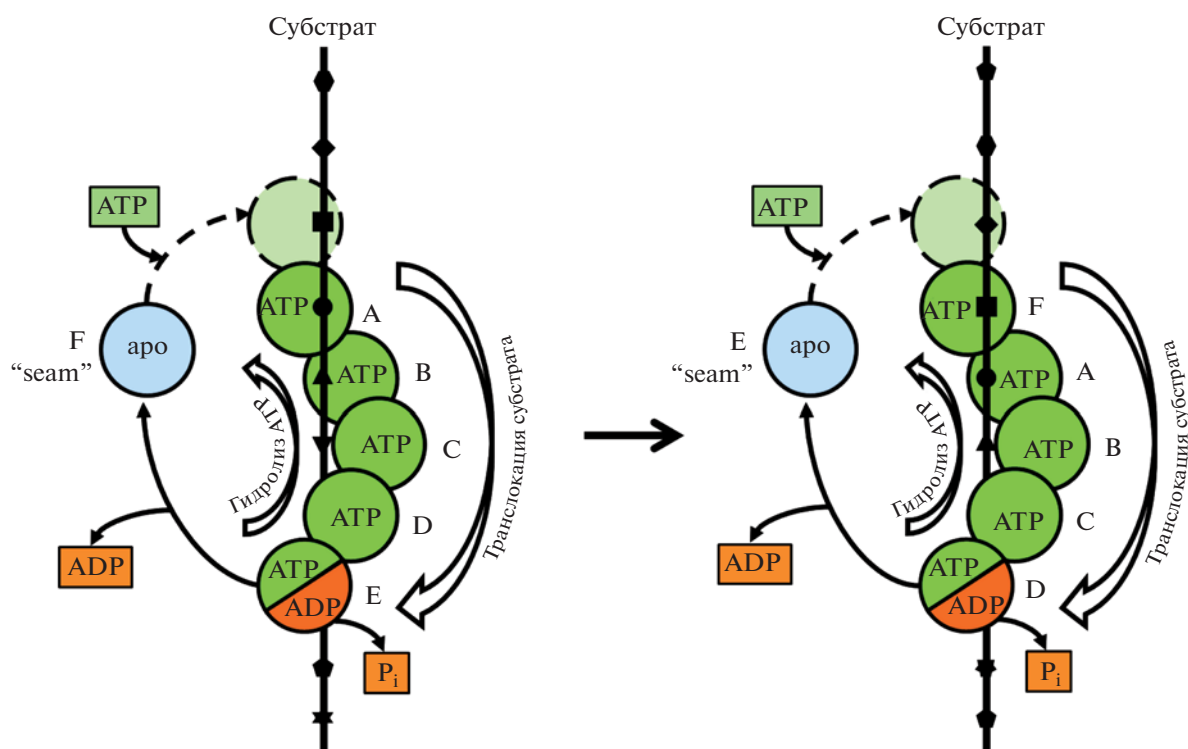


Рис. 10. Схема механизма разворачивания и последовательной транслокации полипептидного субстрата в AAA⁺-белках (по данным работ Puchades et al. [39] и Gates et al. [144]). Показано взаиморасположение протомеров (A–F) в гексамере AAA⁺-белка и их нуклеотидное состояние; отмечены сайты связывания AAA⁺-модулей в последовательности белка-субстрата; “seam” — стыковочная субъединица.

цы”. Это открытие было подтверждено в последующие годы решением крио-ЭМ-структур более чем 50 AAA⁺-белков с различной функциональностью [39, 44, 144, 146–151]. В принятой на настоящий момент модели комплекса AAA⁺-белок*S (где S — белковый субстрат) АТР-разные субъединицы (или протомеры) “обволакивают” со всех сторон белковую мишень, локализованную в вертикальном центральном канале AAA⁺-белка (рис. 10) [144]. При этом пять субъединиц (А–Е), связанных с АТР, но имеющих различные конформации [144, 146, 152], непосредственно контактируют с белком-субстратом посредством петель *rope loop-1* (GYVG), обращенных внутрь канала. В то же самое время шестая субъединица F (“стыковочная”, “seam”), пребывающая сначала в ADP-связанном, а затем в apo-состоянии, оказывается свободной от субстрата и располагается между верхней (А) и нижней (Е) субъединицами (рис. 10). Установлено, что соседние субъединицы, контактирующие с субстратом, разделены расстоянием в 6 Å (дистанция в 2 а.о. в последовательности субстрата) и повернуты друг относительно друга на 60° (отражение симметричности кольцевого гексамера). Особо следует отметить, что в отсутствие субстратов AAA⁺-белки могут принимать множество различных конформаций (формируя в том числе плоские симметричные кольца), что определяется различием их экстрадоменов и/или включением в некоторых случаях дополнительных вставочных элементов структуры [39, 144, 147].

Механизм поэтапной транслокации белка-мишени, регулируемой гидролизом АТР, подтвержден для целого ряда AAA⁺-белков [39, 144, 146, 147], причем установлено, что ключевую роль в процессе транслокации играют крупномасштабные конформационные перестройки внутри AAA⁺-модулей, происходящие с участием междоменных линкеров. Аллостерическое влияние нуклеотидного состояния АТР-разных субъединиц AAA⁺-гексамера приводит к различному расположению ключевых остатков тирозина петель GYVG в аксиальном канале, что обеспечивает прочный захват субстрата и реализацию последовательного кругового цикла гидролиза АТР (“around-the-ring ATP hydrolysis cycle”), первый этап которого происходит в нижней субъединице Е. Образование ADP и высвобождение фосфата дестабилизируют междоменные взаимодействия внутри этой субъединицы (в частности, за счет увеличения угла поворота между NB- и H-доменами AAA⁺-модуля) и, кроме того, ослабляют ее взаимодействия с другими субъединицами (вследствие нарушения связи ISS-мотива и остатка “аргининовый палец” с нуклеотидом соседней субъединицы). Все это приводит к отсоединению субъединицы Е как от субстрата, так и от смеж-

ной субъединицы D и ее передвижению к вершине спирали (рис. 10). Одновременно АТР-содержащие субъединицы (А–D), связанные с субстратом, продвигаются вниз по спирали в виде единой жесткой конструкции (rigid body), обеспечивая тем самым разворачивание и нисходящую транслокацию субстрата внутри центрального канала. Вместе с тем в отделенной на предыдущей стадии стыковочной seam-субъединице F происходит обмен ADP на АТР, и она снова становится способной к установлению стабильного взаимодействия с соседней субъединицей (А) и к связыванию с белковой мишенью в сайте, расположенном на 2 а.о. выше, чем сайт связывания субъединицы А (рис. 10). Таким образом, эта модель предполагает регулярное пошаговое перемещение AAA⁺-гексамера вдоль субстрата. При этом в каждом цикле транслокации гидролизуются одна молекула АТР, и в любой момент времени четыре субъединицы, связанные с АТР, остаются в контакте с субстратом, предотвращая его случайное “скольжение” в канале или высвобождение.

Для большей наглядности Puchades et al. [39] проводят аналогию между представленным “каскадным” механизмом транслокации и подтягиванием саней с помощью привязанной к ним веревки, когда согласованно работают шесть рук: они поочередно дотягиваются до веревки, схватывают ее и тянут (механизм “hand-over-hand” — “из руки в руку”). Руки попеременно отпускают веревку внизу и хватают ее сверху, при этом веревка все время остается плотно зажатой четырьмя “центрными” руками, и каждый цикл сопровождается тяговым усилием. Совокупность подобных движений в AAA⁺-белке обеспечивает постоянный захват и удерживание субстрата, а также его ступенчатую транслокацию, которая сочетается с последовательными круговыми циклами гидролиза АТР, протекающего в субъединицах гексамерного кольца шаперона в направлении против часовой стрелки (рис. 10).

Описанный выше основной механизм транслокации субстрата в направлении по часовой стрелке, называемый SC/2R (Sequential Clockwise/2-Residue step), зачастую рассматривается как универсальный для AAA⁺-белков, выполняющих разные функции [144, 146, 149]. Тем не менее существует ряд примеров функционирования белков по альтернативным механизмам. Так, транслокация белкового субстрата шапероном ClpX происходит по модели SC/6R, когда каждый цикл гидролиза АТР сопряжен с перемещением AAA⁺-гексамера сразу на 6 а.о. [153]. Кроме того, в работе Fei et al. [153] обсуждаются также модели транслокации, реализация которых приводит к изменению не только диапазона перемещения АТР-разных субъединиц (вплоть до 30 а.о. и более), но и направления их передвижения (против часо-

вой стрелки). Помимо этого, для некоторых AAA⁺-шаперонов обнаружено, что цикл транслокации субстрата может быть связан с перемещением не одной, а двух стыковочных АТР-разных субъединиц [151].

*Крио-ЭМ-структуры EcLon
и других LonA-протеаз*

Проводимое в самые последние годы в ряде лабораторий изучение полноразмерных LonA-протеаз методом крио-ЭМ позволило получить новые данные о строении бактериальных ферментов из *E. coli* (*EcLon*) [154], *M. taiwanensis* (*MtLon*) [155] и *Yersinia pestis* (*YpLon*) [156], а также эукариотической LonA-протеазы человека (*HumLon*) [157]. Обнаружено, что подобно описанным выше индивидуальным AAA⁺-шаперонам АТР-разные модули протомеров LonA-протеаз, выступающие центральными фрагментами единой полипептидной цепи этих сложных ферментов, которые фланкированы N-концевыми областями и C-концевыми протеазными доменами, также формируют активные гексамерные комплексы с архитектурой “винтовой лестницы” (табл. 4).

Вместе с тем следует подчеркнуть, что долгое время даже с помощью крио-ЭМ не удавалось выявить структуру N-концевых областей полноразмерных LonA-протеаз, включающих N-домен и большую часть вставочного α -спирализованного HI(CC)-домена, вследствие высокой гибкости этого региона в протомерах ферментов (табл. 4). При этом использование электронной микроскопии низкого разрешения (ЭМ) для изучения укороченной *HumLon*-протеазы, лишенной N-домена, показало, что фрагменты HI(CC)-доменов противостоящих субъединиц фермента объединяются в димерные пары (A–D, B–E и C–F), из которых складывается тример димеров, формирующий вход в аксиальный канал, образованный AAA⁺-модулями фермента [158]. Эти данные успешно подтверждены вновь полученными с помощью крио-ЭМ структурами полноразмерных бактериальной LonA-протеазы из *Thermus thermophilus* (*TtLonA*) [159] и *HumLon*-протеазы [160, 161]. Есть основания полагать, что выявленная организация N-концевых областей LonA-протеаз топологически подобна структурам входных отверстий в аксиальные каналы, сформированным N-концевыми экстрадоменами других шаперонов-транслоказ (ClpX, ClpB, AAA⁺-АТР-азы эукариотических и архейных протеасом [88, 91, 92, 148]) (см. подраздел “Основные характеристики некаталитических экстрадоменов АТР-зависимых протеаз”). Можно ожидать, что углубленный анализ новых структур даст возможность получить также ответы на вопросы о позиции и структурной роли уникальных N-доменов LonA-

протеаз, служащих структурными аналогами RUA-доменов (см. подраздел “Различие функций доменов, формирующих N-концевую область LonA-протеаз”), но пока остаются недостаточно охарактеризованными.

На примере полноразмерной *EcLon*-протеазы методом ЭМ было также обнаружено сосуществование двух олигомерных форм фермента – гексамерной и додекамерной, где додекамеры образованы в результате непосредственного взаимодействия N-концевых областей гексамеров *EcLon* по типу “голова к голове” [154, 162, 163]. Детали структуры, механизм функционирования и биологическую значимость додекамерной формы LonA-протеаз еще предстоит выяснить.

Участники LonA-подсемейства, исследованные методом крио-ЭМ, характеризуются высоким сходством своих первичных структур (рис. 11). Так, *EcLon* и *YpLon* содержат 91.1% консервативных остатков, а общая степень подобия этих ферментов составляет 98.5%. Степень подобия между *EcLon* и *MtLon* несколько ниже – 77.9% (при 50.1% консервативных остатков), практически те же цифры характеризуют пару *EcLon/TtLon* (77.2 и 50.3%), а подобие между *EcLon* и *HumLon* составляет 70.7% (34.7% консервативных остатков). Консервативны для всех четырех ферментов 27.2% а.о. (общая степень подобия 55.4%).

Наименьший уровень сходства обнаруживают N-домены (39.3%), близки по степени подобия HI(CC)- и H-домены (50.8 и 52.8% соответственно), высокое сходство проявляют нуклеотид-связывающие и протеолитические домены (79.4 и 66.1%). Несмотря на это, в элементах вторичной структуры P-доменов *EcLon*, *YpLon* и *HumLon* обнаруживаются заметные отличия (в частности, в области каталитического остатка серина, рис. 11), что, однако, практически не нарушает их общей топологии.

Установлено (табл. 4), что в отсутствие транслоцируемого белкового субстрата спиральные гексамеры AAA⁺-модулей LonA-протеаз, включающие связанный ADP, принимают открытую левостороннюю конфигурацию [154–157, 160]. При этом *HumLon* олигомеризуется с меньшим шагом спирали, чем ее бактериальные ортологи (*EcLon* и *YpLon*) [157]. Той же левосторонней конфигурации соответствует пространственная организация протеазных доменов ферментов, причем их каталитические центры, экспонированные во внешнюю среду вследствие образования обширной полости между верхним и нижним протомерами, пребывают в неактивных конформациях (состояние фермента – “выключено”, “OFF”) [154–157, 160]. Проявляемое “аутоингибирование” активных центров протеаз позволяет предотвратить вероятную в этих условиях беспо-

Таблица 4. Характеристика структур LonA-протеаз, полученных методом крио-ЭМ

Lon-протеаза, источник, а.о., активный центр	Фрагмент с решенной структурой (XXX–YYY), мутации	Структурные данные			Характеристики LonA-протеазы		Ссылки
		PDB ID, разрешение	условия определения	лиганд	AAA ⁺ -модуль (XXX–YYY), конфигурация, (число seat-субъединиц)	протеазный домен (XXX–YYY), конфигурация активного центра	
<i>EcLon</i> , <i>Escherichia coli</i> , (1–784), S679/K722	(247–775), S679A	6U5Z, 3.50 Å	Отсутствует	ADP	(326–590), открытая левосторонняя “винтовая лестница”, (0)	(591–775), аутоингибируемый активный центр	[154]
<i>YpLon</i> , <i>Yersinia pestis</i> , (1–784), S679/K722	(253–775)	6V11, 3.80 Å	Отсутствует	ADP	(326–590), открытая левосторонняя “винтовая лестница”, (0)	(591–775), аутоингибируемый активный центр	[156]
	(253–775), E424Q	6ON2, 3.00 Å	Y2853 (18 кДа), 7 видимых а.о.; rope loop-1 (Y398) в протомерах A–C	АТР, АDP, Mg	Закрывающаяся правосторонняя “винтовая лестница”, (2)	Функционально активный центр	
<i>MtLon</i> , <i>Meiothermus taiwanensis</i> , (1–793), S678/K721	(245–780)	6WQH, 3.60 Å	Ig2 (25 кДа), 11 видимых а.о.; rope loop-1 (Y397) в протомерах A–D, rope loop-2 (W431) в протомерах A–D	АТР-γ-S, АDP, Bortezomib	(321–594), закрывающаяся правосторонняя “винтовая лестница”, (2)	(595–780), функционально активный центр	[155]

Таблица 4. Продолжение

Lon-протеаза, источник, а.о., активный центр	Фрагмент с решенной структурой (XXX–YYY), мутации	Структурные данные			Характеристики LonA-протеазы		Ссылки
		PDB ID, разре- шение	условия определения белковый субстрат; сайты связывания (ароматический остаток в петле)	лиганд	AAA ⁺ -модуль (XXX–YYY), конфигурация, (число seat- субъединиц)	протеазный домен (XXX–YYY), конформация активного центра	
<i>HumLon</i> , <i>Homo sapiens</i> , (115–959), S855/K898	(421–947)	7KSL, 3.50 Å	Отсутствует	ADP	(416–762), открытая левосторонняя “винтовая лестница”, (0)	(763–947), аутоингибированный активный центр	[157]
	(416–947)	7KSM, 3.2 Å	Эндогенный субстрат неизвестной структуры, 12 видимых а.о.; роге loop-1 (Y565) в протомерах А–Е, роге loop-2 (Y599) в протомерах А, В. Субстрат связан только с AAA ⁺ -гексамером	АТР, ADP, Mg	Закрывающая правосторонняя “винтовая лестница”, (1)	Аутоингибированный активный центр	
	(415–947)	7KRZ, 3.2 Å	Эндогенный субстрат неизвестной структуры, 12 видимых а.о.; роге loop-1 (Y565) в протомерах А–Е. Субстрат связан с AAA ⁺ -гексамером и с Р-доменом	АТР, ADP, Mg, Bortezomib	Закрывающая правосторонняя “винтовая лестница”, (1)	Функционально активный центр	

Таблица 4. Окончание

Lon-протеаза, источник, а.о., активный центр	Фрагмент с решенной структурой (XXX–YYY), мутации	Структурные данные		Характеристики LonA-протеазы		Ссылки
		PDB ID, разре- шение	условия определения белковый субстрат; сайты связывания (ароматический остаток в петле)	лиганд	AAA ⁺ -модуль (XXX–YYY), конфигурация, (число seat- субъединиц)	протеазный домен (XXX–YYY), конформация активного центра
<i>Hum</i> Lon, <i>Homo sapiens</i> , (68–959), S855/K898	(410–949), G106P, R563W, K594M	7P0B, 4.11 Å	Отсутствует	ADP	(416–762), открытая левосторонняя “винтовая лестница”, (0)	(763–949), аутоингибируемый активный центр
		7P09, 2.70 Å	TFAM (25 кДа) (фрагмент), 11 видимых а.о.; роге loop-1 (Y565) в протомерах A–D, роге loop-2 (Y599) в протомерах A–C и E. Субстрат связан только с AAA ⁺ -гексамером	АТР, ADP, Mg	Закрывающая правосторонняя “винтовая лестница”, (1)	Функционально активный центр
	(410–949), G106P, R563W, K594M, K898A	7P0M, 1.75 Å	TFAM (25 кДа) (фрагмент), 11 видимых а.о.; роге loop-1 (Y565) в протомерах A–F. Субстрат связан с AAA ⁺ -гексамером и с Р-доменом	АТР, ADP, Mg	Закрывающая правосторонняя “винтовая лестница”, (1)	Функционально активный центр с мутацией K898A. Субстрат связан с S855

Примечание: Y2853 – белок-регулятор сенсорной трансдукции из *X. pestis*; Ig2 – домены 5 и 6 гелеобразующего фактора ABR-120 из *Dictyostelium discoideum*; TFAM – транскрипционный фактор А митохондрий; АТР-γ-S – аденозин-5'-[γ-тио]трифосфат; Bortezomib – N-[(1R)-1-(дигидроксидборил)-3-метилбутил]-N-(пирозин-2-ил-карбонил)-L-фенилаланинамид.

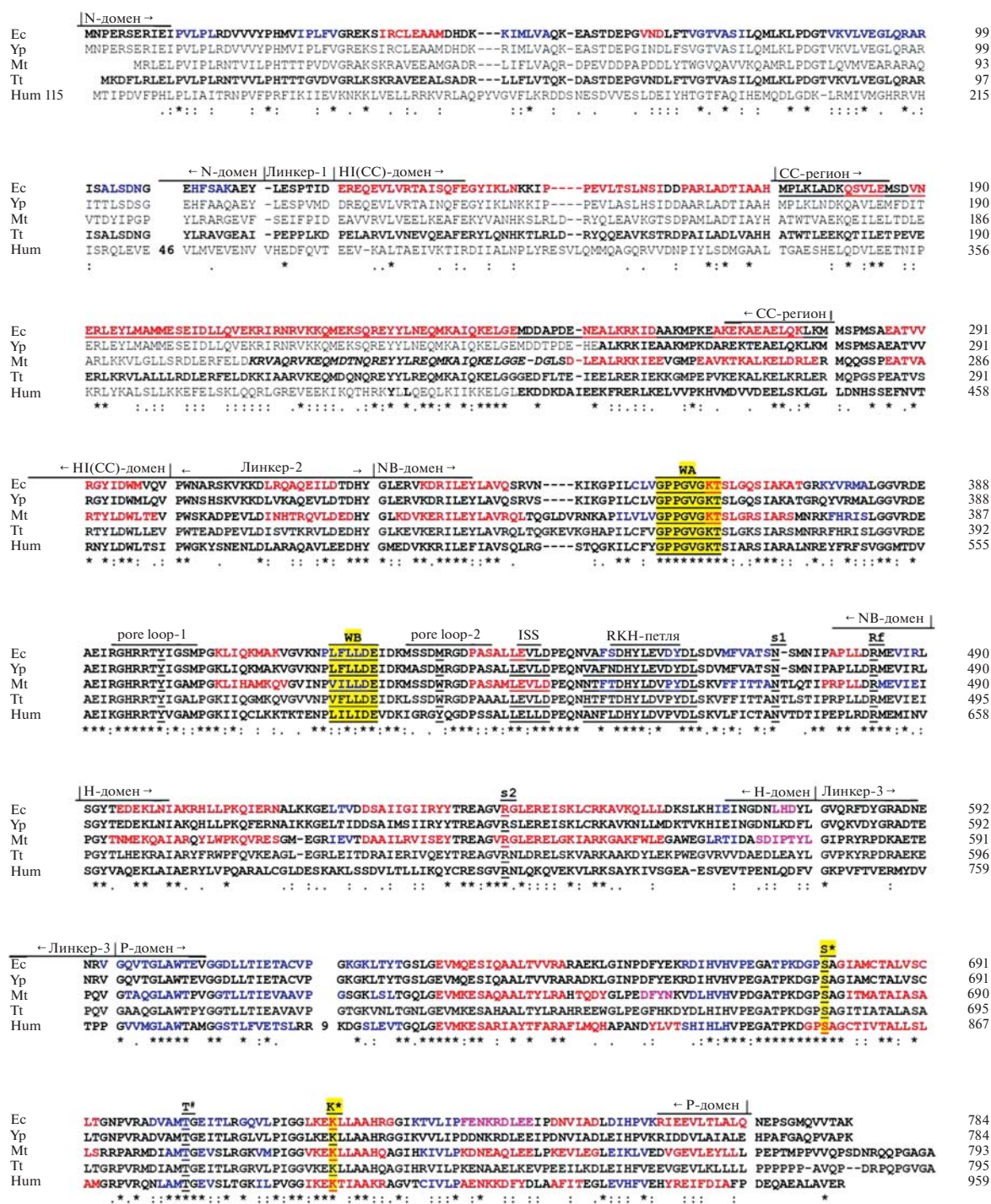


Рис. 11. Сопоставление первичных и вторичных структур LonA-протеаз, для которых получены структурные данные методом крио-ЭМ. Источники LonA-протеаз: Ec – *Escherichia coli* (MER0000485), Yp – *Yersinia pestis* (MER0015528), Mt – *Meiothermus taiwanensis* (MER1037479), Tt – *Thermus thermophilus* (MER0006064), Hum – *Homo sapiens* (MER0000495). Наложение первичных структур проведено с помощью программы <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. Элементы вторичных структур ферментов представлены согласно рентгеноструктурным данным (жирный шрифт, красный цвет – α -спирали, розовый – 3_{10} -спирали, синий – β -тяжи, курсив – фрагменты, не видимые в кристаллических структурах). В последовательностях Yp, Mt и Hum обычным шрифтом показаны фрагменты, не видимые в крио-ЭМ-структурах; для Tt рентгеноструктурные данные отсутствуют. Показаны консенсусные фрагменты: мотивы Уолкера (WA и WB), петли pore loop-1 и pore loop-2 с ключевыми остатками Tug и (Met, Trp, Tyr) соответственно, ISS-фрагмент и RKN-петля, остаток сенсор-1 и сенсор-2 (s1 и s2) и “аргининовый палец” (Rf), каталитические остатки серина (S*) и лизина (K*), важный для активности остаток треонина (T*).

рядочную деградацию белковых молекул клеточного протеома.

В присутствии белка-субстрата гексамеры LonA-протеаз, содержащие также молекулы ADP, ATP (или его медленно гидролизующегося аналога ATP- γ -S) и ионы Mg^{2+} , подвергаются реорганизации в активное состояние, отвечающее за транслокацию субстрата. Эти изменения приводят к формированию вокруг транслоцируемых полипептидов закрытых спиральных правосторонних AAA^+ -конформеров и к перестройке протеазных доменов с образованием симметричных планарных структур с активными каталитическими центрами (состояние ферментов – “включено”, “ON”) [154–157, 160]. При этом в структурах ферментов их AAA^+ -кольца оказываются наклоненными по отношению к центральной оси 6-го порядка колец Р-доменов [160]. Применение борорганического ингибитора бортезомиба приводит к “закреплению” активной конформации протеазных центров [155, 157]. Показано, что конформация активного фермента сохраняется также при введении в *HumLon* мутаций как по мотиву Уолкера WB, так и по каталитическому остатку лизина [157, 160]. Следует отметить, что важную роль при переходе протеазных доменов от спиральной организации к плоскому состоянию играют линкерные фрагменты, соединяющие AAA^+ -модули с Р-доменами (рис. 11). На примере *YpLon*-протеазы отмечено, что левосторонняя спираль гексамера фермента (“OFF”) значительно круче ее правостороннего конформера (“ON”) [156].

Shin et al. [156] полагают, что переход гексамера LonA-протеазы из состояния “OFF” в состояние “ON” инициируется связыванием ATP верхним протомером и взаимодействием его петли *rope loop-1* с белковой мишенью, что обеспечивает энергию, необходимую для реализации начального этапа локального разворачивания субстрата, за которым следует процесс последовательного гидролиза ATP, сопровождающийся пошаговой транслокацией развернутого полипептида в протеазную камеру для деградации.

Описанные к настоящему времени структуры функционально активных LonA-протеаз кроме сходства общей архитектуры, определяемой конфигурацией AAA^+ -модуля, проявляют ряд заметных отличий, обусловленных, главным образом, связыванием белков-субстратов. Так, установлено, что ATPазные кольца бактериальных ферментов (*MtLon* и *YpLon*) состоят из четырех нисходящих по спирали AAA^+ -модулей, взаимодействующих с субстратом, и двух восходящих стыковочных субъединиц [155, 156], в то время как у эукариотической *HumLon*-протеазы в связывании с субстратом участвуют пять AAA^+ -модулей, и только одна субъединица выполняет функцию стыковочной

[157]. При этом в работе Gesé et al. [160] описана ATP-связанная стыковочная субъединица *HumLon*, что противоречит нуклеотидному статусу *seam*-субъединиц, соответствующему основному механизму транслокации (“apo” или комплекс с ADP) (рис. 10). Авторы считают, что обнаруженное состояние отражает промежуточную стадию, которая непосредственно следует за обменом нуклеотидов в стыковочном протомере и предшествует его повторному вовлечению в связывание субстрата.

Еще одно отличие связано с тем, что у некоторых LonA-протеаз во взаимодействии с субстратом кроме основных петель *rope loop-1*, включающих критически важный остаток Туг, могут участвовать также петли *rope loop-2* при условии, что в них содержится остаток ароматической аминокислоты, способный к связыванию с основной цепью белка-субстрата (ферменты *MtLon* и *HumLon* в табл. 4). Дополнительные взаимодействия с петлями *rope loop-2* позволяют визуализировать более протяженные фрагменты последовательностей связанных субстратов (7 а.о. в структуре *YpLon* и 11–12 а.о. в структурах *MtLon* или *HumLon*) [155–157, 160].

Наиболее впечатляющим различием служит тот факт, что для активации протеазных доменов у бактериальных ферментов достаточно “захвата” полипептидного субстрата только AAA^+ -модулями, в то время как для эукариотической *HumLon*-протеазы дополнительным требованием выступает взаимодействие субстрата также и с протеазными активными центрами (табл. 4) [155–157, 160]. Важная характеристика *HumLon* – наличие ATP-зависимой шапероновой активности, причем способность к сворачиванию ряда митохондриальных белковых субстратов сохраняется и у протеолитически неактивного фермента [157]. Авторы полагают, что шапероновая и протеолитическая функции – это независимо регулируемые функции *HumLon*-протеазы, а возможность дифференцированного взаимодействия субстратов с AAA^+ -модулями и Р-доменами служит проявлением функциональной пластичности, необходимой для регулирования разнообразных ролей этого фермента в митохондриях [157].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Охарактеризована система контроля качества белков (СКК), играющая ключевую роль в поддержании сохранности клеточного протеома во всех природных царствах, изложены основные сведения о строении и структурных особенностях участников СКК – молекулярных шаперонов, ATP-зависимых протеаз и мультисубъединичных комплексов, а также обобщены современные данные о структуре, функциональных свойствах и

механизме действия Lon-протеаз, представляющих одно из важнейших семейств СКК. Значительное внимание уделено характеристике ферментов подсемейства LonA, которые, как показано, можно отнести к особому подклассу AAA⁺-белков.

Отдельный раздел посвящен применению метода криоэлектронной микроскопии к изучению представителей СКК. Отмечено, что с помощью этого метода определены структуры целого ряда протеаз и шаперонов AAA⁺-суперсемейства, обладающих транслоказными свойствами, а также выявлены как общие этапы, так и различающиеся стадии в уникальных механизмах их функционирования. Несомненным успехом явилось также определение крио-ЭМ-структур полноразмерных HumLon- и TtLon-протеаз, что позволило смоделировать N-концевые области этих молекул, строение которых ранее не было известно. Однако вследствие низкого разрешения и недостаточного качества карт электронной плотности детали структур на атомном уровне в этих областях ферментов остаются нераскрытыми. При этом очевидно, что несмотря на схожесть общей ориентации характеристических длинных спиралей в HI(CC)-доменах бактериального и эукариотического ферментов, их фактическая архитектура значительно различается. В этой связи остаются актуальными дальнейшие углубленные исследования молекулярных принципов и степени консервативности механизмов действия AAA⁺-белков СКК (в том числе Lon-протеаз), поскольку они вовлечены в протекание таких процессов, как окислительный стресс, нейродегенеративные нарушения, проявление вирулентности и канцерогенез, что дает основание рассматривать их в качестве перспективных диагностических биомаркеров и терапевтических мишеней при лечении ряда патологий.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-00646-а — характеристика системы контроля качества клеточных белков) и Российского научного фонда (проект № 21-74-20154 — анализ структурных особенностей и механизма функционирования LonA-протеаз).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Balchin D., Hayer-Hartl M., Hartl F.U. // Science. 2016. V. 353. P. aac4354. <https://doi.org/10.1126/science.aac4354>
2. Gottesman S., Wickner S., Maurizi M.R. // Genes Dev. 1997. V. 11. P. 815–823. <https://doi.org/10.1101/gad.11.7.815>
3. Kovacs D., Szabo B., Pancsa R., Tompa P. // Arch. Biochem. Biophys. 2013. V. 531. P. 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.09.010>
4. Jeng W., Lee S., Sung N., Lee J., Tsai F.T.F. // F1000Res. 2015. V. 4. P. 1448. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7214.1>
5. Schubert U., Anton L.C., Gibbs J., Norbury C.C., Yewdell J.W., Bennink J.R. // Nature. 2000. V. 404. P. 770–774. <https://doi.org/10.1038/35008096>
6. Clausen L., Abildgaard A.B., Gersing S.K., Stein A., Lindorff-Larsen K., Hartmann-Petersen R. // Adv. Protein Chem. Struct. Biol. 2019. V. 114. P. 61–83. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2018.09.002>
7. Mogk A., Huber D., Bukau B. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2011. V. 3. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004366>
8. Finka A., Mattoo R.U.H., Goloubinoff P. // Annu. Rev. Biochem. 2016. V. 85. P. 715–742. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014124>
9. Мельников Э.Э., Ротанова Т.В. // Биоорг. химия. 2010. Т. 36. С. 5–14. [Melnikov E.E., Rotanova T.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2010. V. 36. P. 1–10.] <https://doi.org/10.1134/S1068162010010012>
10. Hoffmann A., Bukau B., Kramer G. // Biochim. Biophys. Acta. 2010. V. 1803. P. 650–661. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.017>
11. Jee H. // J. Exerc. Rehabil. 2016. V. 12. P. 255–259. <https://doi.org/10.12965/jer.1632642.321>
12. Richter K., Haslbeck M., Buchner J. // Mol. Cell. 2010. V. 40. P. 253–266. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.006>
13. Saibil H. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2013. V. 14. P. 630–642. <https://doi.org/10.1038/nrm3658>
14. Dahiya V., Buchner J. // Adv. Protein Chem. Struct. Biol. 2019. V. 114. P. 1–60. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2018.10.001>
15. Mattoo R.U.H., Goloubinoff P. // Cell. Mol. Life Sci. 2014. V. 71. P. 3311–3325. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1627-y>
16. Weibezahn J., Bukau B., Mogk A. // Microbial. Cell Fact. 2004. V. 3. P. 1. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-3-1>
17. Bascos N.A.D., Landry S.J. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 6195. <https://doi.org/10.3390/ijms20246195>
18. Voos W. // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1833. P. 388–399. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.06.005>
19. Chakafana G., Zininga T., Shonhai A. // Biomolecules. 2019. V. 9. P. 543. <https://doi.org/10.3390/biom9100543>

20. *Rosenzweig R., Nillegoda N.B., Mayer M.P., Bukau B.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2019. V. 20. P. 665–680.
<https://doi.org/10.1038/s41580-019-0133-3>
21. *Kampinga H.H., Craig E.A.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2010. V. 11. P. 579–592.
<https://doi.org/10.1038/nrm2941>
22. *Takakuwa J.E., Nitika, Knighton L.E., Truman A.W.* // Front. Mol. Biosci. 2019. V. 6. P. 81.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00081>
23. *Walter S.* // Cell. Mol. Life Sci. 2002. V. 59. P. 1589–1597.
<https://doi.org/10.1007/pl00012485>
24. *Bar-Lavan Y., Shemesh N., Ben-Zvi A.* // Essays Biochem. 2016. V. 60. P. 237–253.
<https://doi.org/10.1042/EBC20160004>
25. *Taguchi H.* // J. Mol. Biol. 2015. V. 427. P. 2912–2918.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.04.007>
26. *Chaudhuri T.K., Verma V.K., Maheshwari A.* // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2009. V. 99. P. 42–50.
<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2008.10.007>
27. *Prodromou C.* // Biochem. J. 2016. V. 473. P. 2439–2452.
<https://doi.org/10.1042/BCJ20160005>
28. *Li J., Buchner J.* // Biomed. J. 2013. V. 36. P. 106–117.
<https://doi.org/10.4103/2319-4170.113230>
29. *Pearl L.H.* // Biopolymers. 2016. V. 105. P. 594–607.
<https://doi.org/10.1002/bip.22835>
30. *Luengo T.M., Mayer M.P., Rüdiger S.G.D.* // Trends Cell Biol. 2019. V. 29. P. 164–177.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.10.004>
31. *Genest O., Wickner S., Doyle S.M.* // J. Biol. Chem. 2019. V. 294. P. 2109–2120.
<https://doi.org/10.1074/jbc.REV118.002806>
32. *Haslbeck M., Vierling E.* // J. Mol. Biol. 2015. V. 427. P. 1537–1548.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.002>
33. *Mogk A., Ruger-Herreros C., Bukau B.* // Annu. Rev. Microbiol. 2019. V. 73. P. 89–110.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115515>
34. *Obuchowski I., Liberek K.* // Cell Stress Chaperones. 2020. V. 25. P. 593–600.
<https://doi.org/10.1007/s12192-020-01094-0>
35. *Haslbeck M., Weinkauff S., Buchner J.* // J. Biol. Chem. 2019. V. 294. P. 2121–2132.
<https://doi.org/10.1074/jbc.REV118.002809>
36. *Riedl M., Strauch A., Catici D.A.M., Haslbeck M.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 5448.
<https://doi.org/10.3390/ijms21155448>
37. *Waters E.R., Vierling E.* // New Phytol. 2020. V. 227. P. 24–37.
<https://doi.org/10.1111/nph.16536>
38. *Neuwald A.F., Aravind L., Spouge J.L., Koonin E.V.* // Genome Res. 1999. V. 9. P. 27–43.
<https://doi.org/10.1101/gr.9.1.27>
39. *Puchades C., Sandate C.R., Lander G.C.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2020. V. 21. P. 43–58.
<https://doi.org/10.1038/s41580-019-0183-6>
40. *Ogura T., Wilkinson A.J.* // Genes Cells. 2001. V. 6. P. 575–597.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00447.x>
41. *Dougan D.A., Mogk A., Zeth K., Turgay K., Bukau B.* // FEBS Lett. 2002. V. 529. P. 6–10.
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03179-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03179-4)
42. *Voos W., Jaworek W., Wilkening A., Bruderek M.* // Essays Biochem. 2016. V. 60. P. 213–225.
<https://doi.org/10.1042/EBC20160009>
43. *Abrahão J., Mokry D.Z., Ramos C.H.I.* // Front. Mol. Biosci. 2017. V. 4. P. 60.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00060>
44. *Yokom A.L., Gates S.N., Jackrel M.E., Mack K.L., Su M., Shorter J., Southworth D.R.* // Nat. Struct. Mol. Biol. 2016. V. 23. P. 830–837.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.3277>
45. *Barends T.R., Werbeck N.D., Reinsteinst J.* // Curr. Opin. Struct. Biol. 2010. V. 20. P. 46–53.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.12.014>
46. *Miller J.M., Lin J., Li T., Lucius A.L.* // J. Mol. Biol. 2013. V. 425. P. 2795–2812.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.04.019>
47. *Doyle S.M., Wickner S.* // Trends Biochem. Sci. 2009. V. 34. P. 40–48.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.09.010>
48. *Zolkiewski M., Zhang T., Nagy M.* // Arch. Biochem. Biophys. 2012. V. 520. P. 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.01.012>
49. *Lee S., Sowa M.E., Watanabe Y.H., Sigler P.B., Chiu W., Yoshida M., Tsai F.T.* // Cell. 2003. V. 115. P. 229–240.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00807-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00807-9)
50. *Schramm F.D., Schroeder K., Jonas K.* // FEMS Microbiol. Rev. 2020. V. 44. P. 54–72.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuz026>
51. *Voos W.* // Res. Microbiol. 2009. V. 160. P. 718–725.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.08.003>
52. *Mogk A., Kummer E., Bukau B.* // Front. Mol. Biosci. 2015. V. 2. P. 22.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2015.00022>
53. *Watanabe Y.H., Nakazaki Y., Suno R., Yoshida M.* // Biochem. J. 2009. V. 421. P. 71–77.
<https://doi.org/10.1042/BJ20082238>
54. *Gottesman S.* // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2003. V. 19. P. 565–587.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.110701.153228>
55. *Koodathingal P., Jaffe N.E., Kraut D.A., Prakash S., Fishbain S., Herman C., Matouschek A.* // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 18674–18684.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M900783200>
56. *Sauer R.T., Baker T.A.* // Annu. Rev. Biochem. 2011. V. 80. P. 587–612.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060408-172623>
57. *Mahmoud S.A., Chien P.* // Annu. Rev. Biochem. 2018. V. 87. P. 677–696.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012848>
58. *Maupin-Furlow J.A.* // Subcell Biochem. 2013. V. 66. P. 297–327.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-5940-4_11
59. *Ciechanover A.* // Cell. 1994. V. 79. P. 13–21.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90396-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90396-4)

60. Bard J.A.M., Goodall E.A., Greene E.R., Jonsson E., Dong K.C., Martin A. // *Annu. Rev. Biochem.* 2018. V. 87. P. 697–724.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-011931>
61. Ciechanover A., Stanhill A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1843. P. 86–96.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.07.007>
62. Kudriaeva A., Kuzina E.S., Zubenko O., Smirnov I.V., Belogurov A., Jr. // *FASEB J.* 2019. V. 33. P. 6852–6866.
<https://doi.org/10.1096/fj.201802237R>
63. Iyer L.M., Leipe D.D., Koonin E.V., Aravind L. // *J. Struct. Biol.* 2004. V. 146. P. 11–31.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2003.10.010>
64. Lupas A.N., Martin J. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2002. V. 12. P. 746–753.
[https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(02\)00388-3](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(02)00388-3)
65. Chang C.W., Lee S., Tsai F.T.F. // *Front. Mol. Biosci.* 2017. V. 4. P. 27.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00027>
66. Miller J.M., Enemark E.J. // *Archaea.* 2016. V. 2016. P. 9294307.
<https://doi.org/10.1155/2016/9294307>
67. Wendler P., Ciniawsky S., Kock M., Kube S. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1823. P. 2–14.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.06.014>
68. Ogura T., Whiteheart S.W., Wilkinson A.J. // *J. Struct. Biol.* 2004. V. 146. P. 106–112.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2003.11.008>
69. Martin A., Baker T.A., Sauer R.T. // *Mol. Cell.* 2008. V. 29. P. 441–450.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.02.002>
70. Gur E., Ottofueiling R., Dougan D.A. // *Subcell. Biochem.* 2013. V. 66. P. 3–33.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-5940-4_1
71. Kirstein J., Schlothauer T., Dougan D.A., Lilie H., Tischendorf G., Mogk A., Bukau B., Turgay K. // *EMBO J.* 2006. V. 25. P. 1481–1491.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601042>
72. Mogk A., Bukau B. // *Curr. Biol.* 2004. V. 14. P. 78–80.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.12.051>
73. Ротанова Т.В., Мельников Э.Э. // *Биомед. химия.* 2008. Т. 54. С. 512–530. [Rotanova T.V., Melnikov E.E. // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B. Biomed. Chem.* 2008. V. 2. P. 245–257.]
<https://doi.org/10.1134/S1990750808030049>
74. Sauer R.T., Bolton D.N., Burton B.M., Burton R.E., Flynn J.M., Grant R.A., Hersch G.L., Joshi S.A., Kenniston J.A., Levchenko I., Neher S.B., Oakes E.S., Siddiqui S.M., Wah D.A., Baker T.A. // *Cell.* 2004. V. 119. P. 9–18.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.020>
75. Kim Y.I., Levchenko I., Fraczowska K., Woodruff R.V., Sauer R.T., Baker T.A. // *Nat. Struct. Biol.* 2001. V. 8. P. 230–233.
<https://doi.org/10.1038/84967>
76. Olivares A.O., Baker T.A., Sauer R.T. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2016. V. 14. P. 33–44.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.4>
77. Kirstein J., Moliere N., Dougan D.A., Turgay K. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2009. V. 7. P. 589–599.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2185>
78. Mukherjee S., Bree A.C., Liu J., Patrick J.E., Chien P., Kearns D.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. P. 250–255.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1417419112>
79. Lo J.H., Baker T.A., Sauer R.T. // *Protein Sci.* 2001. V. 10. P. 551–559.
<https://doi.org/10.1110/ps.41401>
80. Kojetin D.J., McLaughlin P.D., Thompson R.J., Dubnau D., Prepiak P., Rance M., Cavanagh J. // *J. Mol. Biol.* 2009. V. 387. P. 639–652.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.01.046>
81. Elsholz A.K.W., Birk M.S., Charpentier E., Turgay K. // *Front. Mol. Biosci.* 2017. V. 4. P. 44.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00044>
82. Hinnerwisch J., Reid B.G., Fenton W.A., Horwich A.L. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 40838–40844.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M507879200>
83. Dougan D.A., Reid B.G., Horwich A.L., Bukau B. // *Mol. Cell.* 2002. V. 9. P. 673–683.
[https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00485-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00485-9)
84. Wang F., Mei Z., Qi Y., Yan C., Qi H., Wang J., Shi Y. // *Nature.* 2011. V. 471. P. 331–335.
<https://doi.org/10.1038/nature09780>
85. Mogk A., Schlieker C., Strub C., Rist W., Weibezahn J., Bukau B. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 17615–17624.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M209686200>
86. Cashikar A.G., Schirmer E.C., Hattendorf D.A., Glover J.R., Ramakrishnan M.S., Ware D.M., Lindquist S.L. // *Mol. Cell.* 2002. V. 9. P. 751–760.
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00499-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00499-9)
87. Wendler P., Shorter J., Snead D., Plisson C., Clare D.K., Lindquist S., Saibil H.R. // *Mol. Cell.* 2009. V. 34. P. 81–92.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.02.026>
88. Donaldson L.W., Wojtyra U., Houry W.A. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 48991–48996.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M307826200>
89. Miethke M., Hecker M., Gerth U. // *J. Bacteriol.* 2006. V. 188. P. 4610–4619.
<https://doi.org/10.1128/JB.00287-06>
90. Tomko R.J., Jr., Hochstrasser M. // *Cell Biochem. Biophys.* 2011. V. 60. P. 13–20.
<https://doi.org/10.1007/s12013-011-9178-4>
91. Zhang F., Hu M., Tian G., Zhang P., Finley D., Jeffrey P.D., Shi Y. // *Mol. Cell.* 2009. V. 34. P. 473–484.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.021>
92. Djuranovic S., Hartmann M.D., Habeck M., Ursinus A., Zwickl P., Martin J., Lupas A.N., Zeth K. // *Mol. Cell.* 2009. V. 34. P. 580–590.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.030>
93. Zhang F., Wu Z., Zhang P., Tian G., Finley D., Shi Y. // *Mol. Cell.* 2009. V. 34. P. 485–496.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.022>
94. Sousa M.C., Trame C.B., Tsuruta H., Wilbanks S.M., Reddy V.S., McKay D.B. // *Cell.* 2000. V. 103. P. 633–643.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00166-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00166-5)

95. Sundar S., Baker T.A., Sauer R.T. // *Protein Sci.* 2012. V. 21. P. 188–198.
<https://doi.org/10.1002/pro.2001>
96. Scharfenberg F., Serek-Heuberger J., Coles M., Hartmann M.D., Habeck M., Martin J., Lupas A.N., Alva V. // *J. Mol. Biol.* 2015. V. 427. P. 910–923.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.12.024>
97. Ramelot T.A., Yang Y., Sahu I.D., Lee H.W., Xiao R., Lorigan G.A., Montelione G.T., Kennedy M.A. // *FEBS Lett.* 2013. V. 587. P. 3522–3528.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.09.009>
98. An J.Y., Sharif H., Kang G.B., Park K.J., Lee J.G., Lee S., Jin M.S., Song J.J., Wang J., Eom S.H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018. V. 495. P. 1201–1207.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.158>
99. Langklotz S., Baumann U., Narberhaus F. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1823. P. 40–48.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.08.015>
100. Rotanova T.V., Melnikov E.E., Khalatova A.G., Makhovskaya O.V., Botos I., Wlodawer A., Gustchina A. // *Eur. J. Biochem.* 2004. V. 271. P. 4865–4871.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04452.x>
101. Ротанова Т.В., Дергоусова Н.И., Морозкин А.Д. // *Биоорг. химия.* 2013. Т. 39. С. 303–319. [Rotanova T.V., Dergousova N.I., Morozkin A.D. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2013. V. 39. P. 268–282.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162013030114>
102. Li M., Rasulova F., Melnikov E.E., Rotanova T.V., Gustchina A., Maurizi M.R., Wlodawer A. // *Protein Sci.* 2005. V. 14. P. 2895–2900.
<https://doi.org/10.1110/ps.051736805>
103. Duman R.E., Löwe J. // *J. Mol. Biol.* 2010. V. 401. P. 653–670.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.06.030>
104. Li M., Gustchina A., Rasulova F.S., Melnikov E.E., Maurizi M.R., Rotanova T.V., Dauter Z., Wlodawer A. // *Acta Cryst.* 2010. V. 66. P. 865–873.
<https://doi.org/10.1107/S090744491001955>
105. Rotanova T.V., Andrianova A.G., Kudzhaev A.M., Li M., Botos I., Wlodawer A., Gustchina A. // *FEBS Open Bio.* 2019. V. 9. P. 1536–1551.
<https://doi.org/10.1002/2211-5463.12691>
106. Маховская О.В., Козлов С., Ботос И., Степнов А.А., Андрианова А.Г., Гущина А.Е., Влодавер А., Мельников Э.Э., Ротанова Т.В. // *Биоорг. химия.* 2007. Т. 33. С. 657–660. [Makhovskaya O.V., Kozlov S., Botos I., Stepnov A.A., Andrianova A.G., Gustchina A.E., Wlodawer A., Melnikov E.E., Rotanova T.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2007. V. 33. P. 610–613.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162007060131>
107. Liao J.H., Kuo C.I., Huang Y.Y., Lin Y.C., Lin Y.C., Yang C.Y., Wu W.L., Chang W.H., Liaw Y.C., Lin L.H., Chang C.I., Wu S.H., Liao J.H., Kuo C.I., Huang Y.Y., Lin Y.C., Lin Y.C. // *PLoS One.* 2012. V. 7. e40226.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040226>
108. Li J.K., Liao J.H., Li H., Kuo C.I., Huang K.F., Yang L.W., Wu S.H., Chang C.I. // *Acta Cryst.* 2013. V. 69. P. 1789–1797.
<https://doi.org/10.1107/S090744491301500X>
109. Gur E., Sauer R.T. // *Genes Dev.* 2008. V. 22. P. 2267–2277.
<https://doi.org/10.1101/gad.1670908>
110. Ngo J.K., Pomatto L.C.D., Davies K.J.A. // *Redox Biol.* 2013. V. 1. P. 258–264.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.01.015>
111. Cheng C.W., Kuo C.Y., Fan C.C., Fang W.C., Jiang S.S., Lo Y.K., Wang T.Y., Kao M.C., Lee A.Y.L. // *Cell Death Dis.* 2013. V. 4. e681.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2013.204>
112. Liu Y., Lan L., Huang K., Wang R., Xu C., Shi Y., Wu X., Wu Z., Zhang J., Chen L., Wang L., Yu X., Zhu H., Lu B. // *Oncotarget.* 2014. V. 5. P. 11209–11224.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.2026>
113. Bulteau A.L., Bayot A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. V. 1807. P. 595–601.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.12.011>
114. Voos W., Pollecker K. // *Biomolecules.* 2020. V. 10. P. 253.
<https://doi.org/10.3390/biom10020253>
115. Lu B. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017. V. 1038. P. 8173–8182.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-6674-0_12
116. Pinti M., Gibellini L., Liu Y., Xu S., Lu B., Cossarizza A. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2015. V. 72. P. 4807–4824.
<https://doi.org/10.1007/s00018-015-2039-3>
117. Quiros P.M., Espanol Y., Acin-Perez R., Rodriguez F., Barcena C., Watanabe K., Calvo E., Loureiro M., Fernandez-Garcia M.S., Fueyo A., Vazquez J., Enriquez J.A., Lopez-Otin C. // *Cell Rep.* 2014. V. 8. P. 542–556.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.018>
118. Bota D.A., Davies K.J.A. // *Free Rad. Biol. Med.* 2016. V. 100. P. 188–198.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.031>
119. Rawlings N.D., Barrett A.J., Thomas P.D., Huang X., Bateman A., Finn R.D. // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 46. P. 624–632.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>
120. Swamy K.S., Goldberg A.L. // *Nature.* 1981. V. 292. P. 652–654.
<https://doi.org/10.1038/292652a0>
121. Liao J.H., Ihara K., Kuo C.I., Huang K.F., Wakatsuki S., Wu S.H., Chang C.I. // *Acta Cryst.* 2013. V. 69. P. 1395–1402.
<https://doi.org/10.1107/S0907444913008214>
122. Bittner L.M., Arends J., Narberhaus F. // *Biopolymers.* 2016. V. 105. P. 505–517.
<https://doi.org/10.1002/bip.22831>
123. Goldberg A.L., Waxman L. // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. P. 12029–12034.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38980-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38980-9)
124. Patterson-Ward J., Tedesco J., Hudak J., Fishovitz J., Becker J., Frase H., McNamara K., Lee I. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1794. P. 1355–1363.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.02.015>
125. Vineyard D., Patterson-Ward J., Berdis A.J., Lee I. // *Biochemistry.* 2005. V. 44. P. 1671–1682.
<https://doi.org/10.1021/bi048618z>

126. Besche H., Tamura N., Tamura T., Zwickl P. // *FEBS Lett.* 2004. V. 574. P. 161–166.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.021>
127. Botos I., Melnikov E.E., Cherry S., Kozlov S., Makhovskaya O.V., Tropea J.E., Gustchina A., Rotanova T.V., Wlodawer A. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 351. P. 144–157.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.008>
128. Botos I., Melnikov E.E., Cherry S., Tropea J., Khalatova A.G., Rasulova F.S., Dauter Z., Maurizi M.R., Rotanova T.V., Wlodawer A., Gustchina A. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 8140–8148.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M312243200>
129. Botos I., Melnikov E.E., Cherry S., Khalatova A.G., Rasulova F.S., Tropea J.E., Maurizi M.R., Rotanova T.V., Gustchina A., Wlodawer A. // *J. Struct. Biol.* 2004. V. 146. P. 113–122.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2003.09.003>
130. Lee A.Y., Chen Y.D., Chang Y.Y., Lin Y.C., Chang C.F., Huang S.J., Wu S.H., Hsu C.H. // *Acta Cryst.* 2014. V. 70. P. 218–230.
<https://doi.org/10.1107/S139900471302631X>
131. Lin C.C., Su S.C., Su M.Y., Liang P.H., Feng C.C., Wu S.H., Chang C.I. // *Structure.* 2016. V. 24. P. 667–675.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2016.03.001>
132. Tzeng S.R., Tseng Y.C., Lin C.C., Hsu C.Y., Huang S.J., Kuo Y.T., Chang C.I. // *eLife.* 2021. V. 10. P. e64056.
<https://doi.org/10.7554/eLife.64056>
133. Su S.C., Lin C.C., Tai H.C., Chang M.Y., Ho M.R., Babu C.S., Liao J.H., Wu S.H., Chang Y.C., Lim C., Chang C.I. // *Structure.* 2016. V. 24. P. 676–686.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2016.03.003>
134. Chen X., Zhang S., Bi F., Guo C., Feng L., Wang H., Yao H., Lin D. // *Protein Sci.* 2019. V. 28. P. 1720–1726.
<https://doi.org/10.1002/pro.3687>
135. Garcia-Nafria J., Ondrovicova G., Blagova E., Levnikov V.M., Bauer J.A., Suzuki C.K., Kutejova E., Wilkinson A.J., Wilson K.S. // *Protein Sci.* 2010. V. 19. P. 987–999.
<https://doi.org/10.1002/pro.376>
136. Bertoni C., Punta M., Fischer M., Yachdav G., Forouhar F., Zhou W., Kuzin A.P., Seetharaman J., Abashidze M., Ramelot T.A., Kennedy M.A., Cort J.R., Belachew A., Hunt J.F., Tong L., Montelione G.T., Rost B. // *Proteins.* 2009. V. 75. P. 760–773.
<https://doi.org/10.1002/prot.22287>
137. Куджаев А.М., Дубовцева Е.С., Серова О.В., Андрианова А.Г., Ротанова Т.В. // *Биоорг. химия.* 2016. Т. 42. С. 421–430. [Kudzhaev A.M., Dubovtseva E.S., Serova O.V., Andrianova A.G., Rotanova T.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2016. V. 42. P. 381–388.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162016040142>
138. Андрианова А.Г., Куджаев А.М., Дубовцева Е.С., Ротанова Т.В. // *Биоорг. химия.* 2017. Т. 43. С. 357–366. [Andrianova A.G., Kudzhaev A.M., Dubovtseva E.S., Rotanova T.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. V. 43. P. 368–376.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162017040021>
139. Куджаев А.М., Андрианова А.Г., Дубовцева Е.С., Серова О.В., Ротанова Т.В. // *Acta Naturae.* 2017. Т. 9. С. 79–86. [Kudzhaev A.M., Andrianova A.G., Dubovtseva E.S., Serova O.V., Rotanova T.V. // *Acta Naturae.* 2017. V. 9. P. 75–81.]
<https://doi.org/10.32607/20758251-2017-9-2-75-81>
140. Куджаев А.М., Дубовцева Е.С., Серова О.В., Андрианова А.Г., Ротанова Т.В. // *Биоорг. химия.* 2018. Т. 44. С. 522–532. [Kudzhaev A.M., Dubovtseva E.S., Serova O.V., Andrianova A.G., Rotanova T.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2018. V. 44. P. 518–527.]
<https://doi.org/10.1134/S0132342318050081>
141. Куджаев А.М., Андрианова А.Г., Серова О.В., Архипова В.А., Дубовцева Е.С., Ротанова Т.В. // *Биоорг. химия.* 2015. Т. 41. С. 579–586. [Kudzhaev A.M., Andrianova A.G., Serova O.V., Arkhipova V.A., Dubovtseva E.S., Rotanova T.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2015. V. 41. P. 518–524.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162015050076>
142. Андрианова А.Г., Куджаев А.М., Абрикосова В.А., Гущина А.Е., Смирнов И.В., Ротанова Т.В. // *Acta Naturae.* 2020. Т. 12. С. 86–97. [Andrianova A.G., Kudzhaev A.M., Abrikosova V.A., Gustchina A., Smirnov I.V., Rotanova T.V. // *Acta Naturae.* 2020. V. 12. P. 102–113.]
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.11197>
143. Glynn S.E., Kardon J.L., Mueller-Cajar O., Cho C. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020. V. 27. P. 515–518.
<https://doi.org/10.1038/s41594-020-0444-2>
144. Gates S.N., Martin A. // *Protein Sci.* 2019. V. 29. P. 407–419.
<https://doi.org/10.1002/pro.3743>
145. Matyskiela M.E., Lander G.C., Martin A. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. V. 20. P. 781–788.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2616>
146. Puchades C., Rampello A.J., Shin M., Giuliano C.J., Wiseman R.L., Glynn S.E., Lander G.C. // *Science.* 2017. V. 358. P. eaao0464.
<https://doi.org/10.1126/science.aao0464>
147. Uchihashi T., Watanabe Y.H., Nakazaki Y., Yamasaki T., Watanabe H., Maruno T., Ishii K., Uchiyama S., Song C.H., Murata K., Iino R., Ando T. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. P. 2147.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-04587-w>
148. Rizo A.N., Lin J.B., Gates S.N., Tse E., Bart S.M., Castellano L.M., DiMaio F., Shorter J., Southworth D.R. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. P. 2393.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-10150-y>
149. Majumder P., Rudack T., Beck F., Danev R., Pfeifer G., Nagy I., Baumeister W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. P. 534–539.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1817752116>
150. Lee S., Roh S.H., Lee J., Sung N., Liu J., Tsai F.T.F. // *Cell Rep.* 2019. V. 26. P. 29–36.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.037>
151. Zhang S., Mao Y. // *Biomolecules.* 2020. V. 10. P. 629.
<https://doi.org/10.3390/biom10040629>
152. de la Pena A.H., Goodall E.A., Gates S.N., Lander G.C., Martin A. // *Science.* 2018. V. 362. P. eaav0725.
<https://doi.org/10.1126/science.aav0725>
153. Fei X., Bell T.A., Jenni S., Stinson B.M., Baker T.A., Harrison S.C., Sauer R.T. // *eLife.* 2020. V. 9. P. e52774.
<https://doi.org/10.7554/eLife.52774>
154. Botos I., Lountos G.T., Wu W., Cherry S., Ghirlando R., Kudzhaev A.M., Rotanova T.V., de Val N., Tropea J.,

- Gustchina A., Wlodawer A.* // *Curr. Res. Struct. Biol.* 2019. V. 1. P. 13–20.
<https://doi.org/10.1016/j.crstbi.2019.10.001>
155. *Li S., Hsieh K.Y., Su S.C., Pintilie G.D., Zhang K., Chang C.I.* // *J. Biol. Chem.* 2021. V. 297. P. 101239.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101239>
156. *Shin M., Puchades C., Asmita A., Puri N., Adjei E., Wiseman R.L., Karzai A.W., Lander G.C.* // *Sci. Adv.* 2020. V. 6. P. eaba8404.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aba8404>
157. *Shin M., Watson E.R., Song A.S., Mindrebo J.T., Novick S.J., Griffin P.R., Wiseman R.L., Lander G.C.* // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 3239.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-23495-0>
158. *Kereiche S., Kovacik L., Bednar J., Pevala V., Kunova N., Ondrovicova G., Bauer J., Ambro L., Bellova J., Kutejova E., Raska I.* // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 33631.
<https://doi.org/10.1038/srep33631>
159. *Coscia F., Löwe J.* // *FEBS Lett.* 2021. V. 595. P. 2691–2700.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.14199>
160. *Gesé G.V., Shahzad S., Pardo-Hernández C., Wramstedt A., Falkenberg M., Hällberg B.M.* // *bioRxiv.* 2021.
<https://doi.org/10.1101/2021.1106.1109.447696>
161. *Mohammed I., Schmitz K.A., Schenck N., Topitsch A., Maier T., Abrahams J.P.* // *bioRxiv.* 2021.
<https://doi.org/10.1101/2021.1107.1128.454137>
162. *Vieux E.F., Wohlever M.L., Chen J.Z., Sauer R.T., Baker T.A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. P. 2002–2008.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1307066110>
163. *Brown B.L., Vieux E.F., Kalastavadi T., Kim S.R., Chen J.Z., Baker T.A.* // *Protein Sci.* 2018. V. 28. P. 1239–1251.
<https://doi.org/10.1002/pro.3553>

ATP-Dependent Lon Proteases in the Cellular Protein Quality Control System

A. M. Kudzhaev*, A. G. Andrianova*, A. E. Gustchina**, I. V. Smirnov*, and T. V. Rotanova*, #

#Phone: +7(495)335-42-22; e-mail: tatyana.rotanova@ibch.ru

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
 ul. Mikluho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

**Protein Structure Section, Center for Structural Biology, National Cancer Institute, Frederick, MD 21702, USA

The Protein Quality Control (PQC) system plays a leading role in maintaining the safety of the cellular proteome in all natural kingdoms. This review summarizes information about the structural and functional characteristics of molecular chaperones and energy-dependent proteases that form the PQC system, emphasizing the crucial role of proteins belonging to the AAA⁺ superfamily, with the focus on ATP-dependent Lon proteases as a special family in the PQC. Similarities and differences among the enzymes of individual Lon subfamilies are discussed in detail using up-to-date data, elucidating the structural features and unique mechanisms of functioning of these proteins.

Keywords: Protein Quality Control system, AAA⁺ proteins, molecular chaperones, ATP-dependent proteolysis, Lon proteases, 3D structure, cryo-EM