ДВОЙНАЯ РОЛЬ ШАПЕРОНОВ В ОТВЕТЕ КЛЕТКИ И ВСЕГО ОРГАНИЗМА НА СТРЕСС

© *Б. А. Маргулис, И. В. Гужова*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: margulis@cytspb.rssi.ru

Шапероны представляют собой класс белков, способных узнавать вновь синтезированные или поврежденные полипептиды и далее транспортировать их к местам назначения в клетке или способствовать деградации необратимо испорченных молекул. Члены семейства белков теплового шока Hsp70 можно считать одними из самых первых открытых шаперонов, и к настоящему времени достаточно хорошо изучен шаперонный механизм, основанный на этих белках. С помощью этого механизма Hsp70 выполняет двойственную роль: он исправляет структуру вновь синтезированных или поврежденных полипептидов или способствует деградации «неисправимых» белков в протеасомах. С шаперонной активностью связаны многие функции Hsp70 в клетке и вне ее — защитная и иммуномодулирующая. Защитная активность внутриклеточного шаперона продемонстрирована в огромном количестве экспериментов in vitro и in vivo. К началу 2000-х годов стало очевидным, что Hsp70 может выходить из клеток под действием некоторых стрессовых факторов, причем ставший экзогенным белок оказывает ряд эффектов на клетки системы врожденного иммунитета, что говорит о том, что Hsp70 играет защитную роль уже на уровне целого организма. Одной из задач обзора является описание тех функций внутри и вне клетки, которые выполняет шаперон. В силу своих особенностей белок Hsp70 представляет значительный интерес для создания новых терапевтических технологий. Это направление на практическое использование шаперона также освещено в обзоре.

Ключевые слова: белок теплового шока, шапероны, рак, нейродегенеративные заболевания.

В 1982 г. в Колд Спринг Харбор Лаборатории (США) состоялась первая конференция, посвященная новой для того времени теме — белкам теплового шока (Hsp). Основные выводы, сформулированные в сборнике трудов с претенциозным названием «Heat Shock Proteins: From Bacteria to Man», звучат следующим образом: 1) обнаружены белки (теплового шока), экспрессия генов которых запускается не только тепловым стрессом, но и целым рядом различных факторов и патогенов; 2) синтез этих белков наблюдается под действием стресса во всех исследованных видах животного и растительного царства. Кроме того, стало очевидным, что существует несколько классов или семейств Hsp, которые стали обозначать в соответствии с величиной молекулярной массы их представителей: Hsp25—27 («малые» Hsp), Hsp32 (появляющиеся в ходе ответа клетки на тяжелые металлы), Hsp40 (известен также как кошаперон Hsp70, Hdj1), Hsp60, Hsp70, Hsp90 и Hsp100.

С тех пор прошло 26 лет, выпущено более 40 000 статей, монографий и диссертаций, и сейчас можно подвести некоторые итоги этих работ. В первые несколько лет после открытия белков Hsp две цели привлекли внимание исследователей: как регулируется синтез этих белков и какую роль они играют в клетке. В работах четырех американских групп были получены данные о структуре генов некоторых Hsp и установлено, что в 5′-нетранскрибируемой области большинства из них имеются так называемые элементы теплового шока, обращенные повторы GAA-AAG (HSE). В 1982—1986 гг. были выявлены белки, избирательно узнающие такие последовательности — факторы теплового шока (HSF), а несколькими годами позже выяснилось, что существует несколько факторов, по-разному устроенных и управляющих экспрессией генов Hsp. В этой связи интересными являются два обстоятельства: 1) регуляция активности HSF может осуществляться по схеме обратной связи самими Hsp, например Hsp90; 2) в процессе активации генов БТШ работают целые комплексы транскрипционных факторов, помогающих или подавляющих активность друг друга (Akerfelt et al., 2007). К настоящему времени постулируется, что факторы теплового шока вместе или по отдельности играют важнейшую роль в развитии организма на разных фазах и в модулировании реакции тканей и органов на неблагоприятные факторы среды. Следует отметить, что разработаны технологии, позволяющие оценить готовность клеток к действию цитотоксических факторов, а также определить действие лекарственных препаратов — потенциальных индукторов Hsp (Westerheide et al., 2004).

К середине 1980-х годов стало очевидным, что запускать синтез Hsp могут молекулы поврежденных белков; чуть позднее к мишеням Hsp стали относить вновь синтезированные белки. Синтез белков происходит в течение достаточно длительного времени, и растущая полипептидная цепь в это время должна существовать в агрессивном окружении так называемого молекулярного столпотворения, краудинга (Чеботарева и др., 2004). Кроме того, появляющиеся в силу действия разнообразных протео- или цитотоксических факторов белки с неверной третич-

ной (четвертичной) структурой также нуждаются в коррекции своей формы. Тогда несколько ученых предположили, что в клетке должны быть белки, поддерживающие другие белковые молекулы в развернутой форме. Х. Пелам (H. Pelham) назвал такие специальные белки анафолдазами (unfoldase), а Джон Эллинс предложил название шаперон (Ellis, 1987). Второе название означает сопровождающее лицо, помощник (от франц. chaperonner), и именно оно, видимо из-за своей звучности, получило широкое распространение.

Одним из первых шаперонов стал белок теплового шока Hsp70. Белки этого семейства объединяют одинаковая молекулярная масса и гомология N-концевого фрагмента. Последняя достигает 50 % у бактериального DnaK и Hsp70 человека. В одной клетке высших можно одновременно встретить несколько компонентов семейства Hsp70: индуцибельный Hsp70, конститутивно синтезирующийся (когнантный) Hsc70, миохондриальный Mtp70 и резидент эндоплазматического ретикулума Grp78 (Маргулис, Гужова, 2000). Ниже мы рассмотрим, как структура Hsp70 определяет одно из важнейших его свойств, шаперонную активность, и как с ней связаны функции белка внутри и вне клетки.

Анализ последовательности гена и позднее структуры самого белка Hsp70 с помощью метода малоуголового рентгеновского рассеяния показал, что молекула Hsp70 состоит из двух доменов — АТФ- и пептидсвязывающего, занимающих соответственно N- и C-концевые фрагменты молекулы. АТФ-связывающий домен является достаточно консервативным в эволюционном отношении, а структура пептидсвязывающего домена достаточно вариабельна; существенно то, что она должна обеспечивать узнавание гидрофобных участков, выходящих на поверхность молекулы белка-субстрата. Достаточно сложная структура Hsp70 не является ригидной, и конформация всего белка зависит от того, с какими молекулами он реагирует в данный момент времени.

Молекула вновь синтезированного, поврежденного стрессом или мутантного белка может экспонировать на своей поверхности гидрофобные группы аминокислот, и в условиях молекулярного краудинга такие белки способны образовывать олигомеры, на основе которых формируются более крупные агрегаты. В борьбе с агрегацией участвуют, в частности, шаперонные системы, основанные на Hsp70. В одной клетке действует несколько таких систем, и все они основаны на каком-либо компоненте семейства Hsp70 и белках-помощниках. В число этих белков входят Hdj1/Hsp40, Hdj2 (белки, содержащие J-домен и подобные бактериальному DnaJ), нуклеотид-обменщики Bag-1 и Hip (Hsc-interacting protein), фактор связывания шаперонов Hsp70 и Hsp90 Hop (Hsp-organizing protein) и др. Согласно принятому сейчас мнению, шаперонный аппарат работает следующим образом. Кошаперон Hdj1 или Hdj2 узнает и связывает белок с измененной структурой и передает последний Hsp70 (Hartl, Hayer-Hartl, 2002). Шаперон в момент связывания находится в связанной с АТФ форме, т. е. в промежуточном состоянии, в котором он может отпустить субстрат или может вступить с ним в достаточно жесткий комплекс. В первом случае шаперон не находит никаких изъянов в молекуле субстратного полипептида, а во втором такие изъяны, точнее экспонированные гидрофобные участки, имеются. Процесс захвата субстрата контролируется каким-либо из белков, содержащих J-домен, например Hdj1, который, связываясь с АТФазным доменом и C-концевой последовательностью аминокислот EEVD, изменяет конформацию Hsp70; при этом происходят инициация АТФазы шаперона и гидролиз АТФ и комплекс субстрата с Hsp70 в АДФ-связанной форме становится устойчивым. Для высвобождения полипептида нужен нуклеотид-обменщик Bag-1, который заменяет АДФ на АТФ, субстратный полипептид отходит, а Hsp70 переходит в промежуточное состояние (Zeiner et al., 1997) (рис. 1).

Дальнейшая судьба освобожденного полипептида зависит от того, насколько его структура выправилась, и в этом плане имеется несколько сценариев. Во-первых, белок, обретший правильную с точки зрения клетки форму, может транспортироваться в органеллы, где он должен функционировать, — в ядро, митохондрии, эндоплазматический ретикулум; отметим, что и транспорт, и вход в органеллы могут также контролироваться шаперонами, включая Hsp70. Во-вторых, в случае недостаточно эффективного исправления структуры субстратного белка он подвергается повторному шаперонированию в основанных системах на Hsp70 или Hsp70—Hsp90 (Hip—Hop). Кроме того, в некоторых случаях белок может пройти коррекцию в бочкообразных клеточных структурах, называемых шаперонинами (Young et al., 2004). Наконец, в случае когда правильная, активная структура белка не может быть восстановлена шаперонами, включается еще один механизм, в котором Hsp70 также играет важную роль.

В середине 1990-х годов появились данные о том, что Hsp70 участвует в направленной деградации белков в 26S-протеасомах. Деградация белков в этих частицах достаточно специфична, и субстратами служат меченные убиквитином белки. Было установлено, что кошаперон Bag-1 участвует в доставке белковых субстратов в протеасомы (Hartmann-Petersen et al., 2003) и что в этот процесс вовлечен еще один белок — CHIP (Carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein). В молекуле CHIP имеется мотив TRP (tetratricopeptide), который необходим для взаимодействия белка с C-терминальными областями молекул шаперонов Hsc70 и Hsp90 (Alberti et al., 2003). Избыточная экспрессия CHIP приводит к подавлению шаперонной активности Hsp70/Hsc70 специфически на этапе ее инициации белком Hdj1. C-терминальная часть CHIP содержит U-box — элемент, структурно сходный с доменами у убиквитинлигаз. В кооперации с конъюгирующими с убиквитином ферментами семейства Ubc4/5 CHIP способен привязывать убиквитин к субстратным молекулам, представляемым шапероном Hsp70 или Hsp90 (Jackson et al., 2000).

Таким образом, основной шаперон Hsp70 с помощью кошаперонов Hdj1 и Bag-1 осуществляет циклы связывания—освобождения субстратных полипептидов. Обмен АТФ—АДФ действует как переключатель конформации Hsp70 до того, как полипептид приобретает свернутую форму и шаперон перестает его узнавать в качестве субстрата, или до того, как CHIP связывается с комплексом Hsp70—субстрат. Bag-1 индуцирует освобождение субстратного пептида из молекулы Hsp70 зависимым от АТФ (АДФ) образом. В то же время CHIP поддерживает шаперон в АТФ-связанном состоянии и катализирует убиквитинилирование субстратного белка, отходящего от Hsp70 при содействии Bag-1 (рис. 1). Так осуществляется двойственная функция Hsp70 по отношению к белковым молекулам: он решает, пройти им дополнительный цикл шаперонирования или удалить неисправимый полипептид из клетки с помощью протеасом.

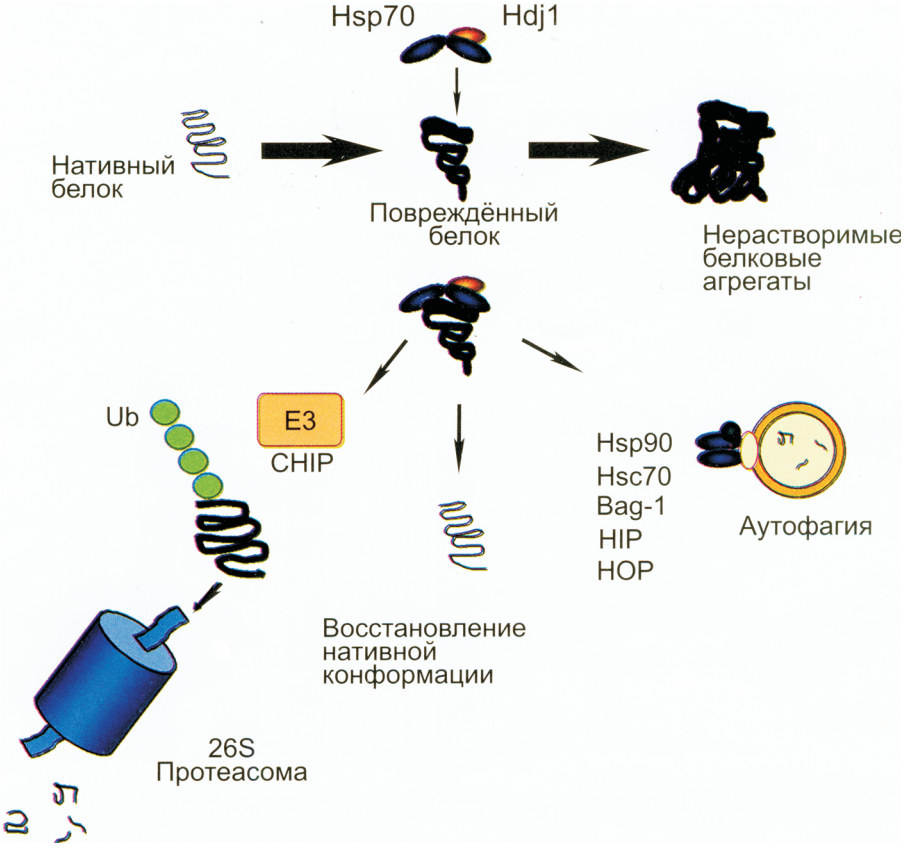

Рис. 1. Схемы работы Hsp70 в эукариотической клетке по восстановлению активной структуры поврежденных и вновь синтезированных полипептидов или удалению белков, не подлежащих восстановлению.

В первом случае Hsp70 с помощью белка-кошаперона Hdj1 связывает субстратный полипептид и поддерживает его, до тех пор пока тот перестанет быть «узнаваем» шапероном; затем в процессе, контролируемом другим кошапероном Bag-1, происходит высвобождение субстратной белковой молекулы в активной конформации. Если белок-мишень восстановлению не подлежит, то белок CHIP совместно с ферментом E3-лигазой контролирует его убиквитинилирование и помогает Hsp70 представить субстрат протеасомам. Помимо протеасом шаперон Hsp70 вместе с другими белками (Hsp90, Bag-1, HIP и HOP) принимает участие в направленном протеолизе субстратов в лизосомах (аутофагия). В этом заключается двойственная функция Hsp70 в клетке: исправление субстратных белков или их удаление.

Шаперонная активность, как считают большинство исследователей, определяет функцию Hsp70 в клетке и вне ее. Из многочисленных свойств белка наибольшее внимание привлекает защитная функция, показанная в огромном числе работ. Эти работы по их задачам и мотивациям можно разделить на три группы: 1) «описательные» исследования, касающиеся защитных эффектов Hsp70 в той или иной модельной системе; 2) изучение молекулярных механизмов защитной активности белка; 3) попытки связать шаперонную и защитную активности.

Исследования, проводимые для того чтобы продемонстрировать защитные эффекты Hsp70 при действии на клетки или целый организм токсических и патогенных факторов, продолжаются по сегодняшний день. Эти работы технологически близки друг другу и включают в себя этап создания модельных клеток с изменяемым уровнем Hsp70. Повышения содержания внутриклеточного Hsp70 можно добиться обработкой клеток мягким тепловым воздействием или трансфекцией клеток геном этого белка под соответствующим промотором. В качестве примера можно привести эксперименты с клетками миелоидной лейкемии человека U-937, трансфекция которых геном *hsp70* привела к повышенной экспрессии шаперона и резкому увеличению устойчивости к сильному тепловому стрессу и действию двух типичных противоопухолевых препаратов — адриамицину и этопозиду (Komarova et al., 2004) (рис. 2). Чтобы, напротив, снизить уровень экспрессии Hsp70, используют технологию с антисмысловой РНК или с короткой, интерферирующей РНК (si-RNA). Можно привести два примера таких экспериментов. В одном из них авторы, подавив экспрессию Hsp70 в клетках саркомы молочной железы человека MCF-7, индуцировали процесс спонтанного апоптоза, механизм которого, как позднее выяснилось, определяется диссоциацией лизосомных мембран (Nylandsted et al., 2000, 2004). В другом случае использование специфических к Hsp70 si-RNA позволило значительно увеличить чувствительность клеток лейкемии человека U-937 к индуцирующему апоптоз действию противоопухолевых препаратов (Afanasyeva et al., 2007).

Возможность увеличить устойчивость клеток и тканей к действию патогенных факторов за счет повышения концентрации Hsp70 привлекает большое число исследователей. К настоящему времени установлен длинный список (который, заметим, постоянно пополняется) факторов, способных индуцировать экспрессию шаперонов. Среди этих факторов есть довольно банальные, например тепловой стресс, и весьма экзотические, такие как магнитное поле, лазеры, гипоксия и многие другие. Отметим, что эти воздействия в индуцирующих Hsp70 дозах пози-

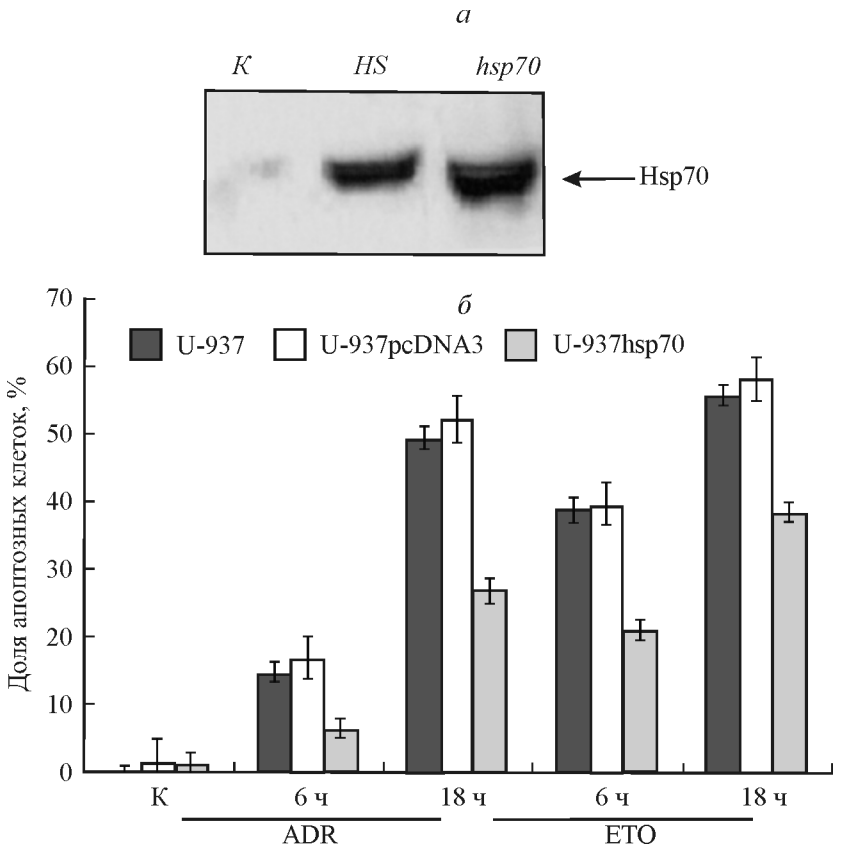

Рис. 2. Доказательство защитной функции Hsp70 с помощью трансфекции клеток соответствующим геном.

Клетки миелоидной лейкемии U-937 трансфицировали геном *hsp70*, что, по данным иммуноблотинга, приводило к увеличению количества белка в клетках (*а*) и повышению устойчивости к проапоптозному действию противоопухолевых лекарств — адриамицина (ADR) и этопозида (ETO) (*б*). *К* — контроль.

ционируются как перспективные терапевтические средства. Существует также значительное количество лекарственных средств, действие которых состоит в индукции Hsp70. К таким лекарствам относятся мемантин, один из наиболее перспективных препаратов для терапии болезни Альцгеймера (Chen et al., 2003), и соли лития, используемые в восстановительной терапии после инсульта мозга (Ren et al., 2003). К этому списку следует добавить большое число препаратов, полученных из растений, в том числе применяемых в традиционной китайской медицине. Хорошим примером таких веществ являются тритерпеновое соединение селастрол и его производные (Westerheide et al., 2004). Селастрол способен активировать фактор теплового шока 1 приблизительно в 10—12 раз сильнее по сравнению с контрольной величиной и соответственно повышать уровень Hsp70 в клетке. Результатом этого повышения является подавление признаков таких значимых патологий, как болезнь Паркинсона и хорея Гентингтона (Brown, 2007; Zhang, Sarge, 2007).

Отметим, что эти исследования проводятся пока на моделях указанных патологий, но есть шансы, что вскоре начнутся клинические испытания подобных препаратов. Кроме селастрола проверку на способность эффективно и безвредно повышать экспрессию Hsp70 проходят десятки препаратов натурального и синтетического происхождения; наиболее перспективными из них являются куркумин из желтого перца (Kanitkar, Bhonde, 2008) и аримокломол (Kalmar et al., 2008). Кроме того, в недавней работе Пан и соавторов (Pan et al., 2005) показано, что вальпроевая кислота, известный блокатор эпилептических судорог, также стимулирует синтез Hsp70. В заключение этого раздела необходимо подчеркнуть значение защитной функции шаперона Hsp70 для терапии, которое находит отражение в двух группах данных: 1) факторы, имеющие терапевтический потенциал, например умеренная гипоксия, способны увеличивать уровень белка; 2) есть необходимость и уже сейчас разрабатываются препараты для повышения экспрессии Hsp70.

Что касается молекулярных механизмов, с помощью которых шаперон осуществляет защитную функцию, следует сразу обратить внимание на работы нескольких групп исследователей, проследивших действие шаперона на отдельные участки апоптозного сигнала. По этой теме в течение последних лет опубликовано несколько обзоров (Гужова и др., 2005; Giffard et al., 2008), суть которых вкратце можно определить так: белок вмешивается в регуляцию процесса апоптоза на всех его этапах. Сомнения в этом были окончательно развеяны результатами, показавшими, что Hsp70 принимает участие в начальной, «домитохондриальной», части регуляторной цепи апоптоза (Steel et al., 2004) и что шаперон предотвращает разрушение лизосомных мембран, которое является одним из основных элементов катепсинзависимого, «автофагового», апоптоза (Nylandsted et al., 2004). Совсем недавно вышла работа, подтверждающая, что шаперон способен подавлять апоптоз путем блокирования выхода катепсинов из лизосом (Bivik et al., 2007).

Хочется упомянуть еще две работы, которые не были цитированы в наших более ранних обзорах. В одной из них авторы устанавливают связь между протекторным

эффектом Hsp70 и его способностью активировать антиапоптозный фактор c-FLIP и связывать и блокировать активность проапоптозного белка APAF-1; эти процессы приводят к подавлению так называемых инициирующих каспаз 8 и 9 и повышению устойчивости нервных клеток к ишемии (гипоксии) (Matsumori et al., 2006). Авторы другой работы исследовали процесс апоптоза, связанный с деполяризацией митохондрий, и установили, что при повышении количества Hsp70 в клетках он помимо других белков связывает и инактивирует в цитоплазме фактор инициации апоптоза AIF-1; при этом не наблюдается типичной для апоптоза фрагментации хроматина (Lui, Kong, 2007).

Защитная функция Hsp70 является существенным фактором поддержания жизнеспособности клеток, которые подвергаются действию стресса или токсинов, и это имеет позитивное значение, если речь не идет о раковых клетках. В раковых клетках, напротив, увеличение содержания белка ведет к повышению устойчивости клеток ко многим цитотоксическим факторам, включая противоопухолевые средства. Те трудности, которые встречаются исследователями, разрабатывающим новые способы противоопухолевой терапии, можно проиллюстрировать на примере гелданамицина (ГА) и его производных. В 1990-е годы выяснилось, что ГА достаточно специфично подавляет активность шаперона Hsp90, действуя на АТФазный домен этого белка. При этом от шаперона отходят связанные с ним белки, в число которых входят различные протеинкиназы, cdc37 и др.; эти белки контролируют клеточный цикл и участвуют в злокачественной трансформации клеток. Поэтому ГА был возведен в ранг новейших и эффективнейших противоопухолевых препаратов. 3—4 года тому назад начали появляться данные, указывающие на двойную роль ГА и его фармакологических производных: выяснилось, что помимо подавления шаперонной активности Hsp90 эти соединения активируют экспрессию гена *hsp70*. Поэтому ГА еще и приобрел себе известность в качестве индуктора белка с высокой защитной активностью. Таким образом, складывается парадоксальная ситуация: мы вызываем смерть раковых клеток и одновременно защищаем их. В одной из недавних работ показано, что ГА и его фармакоформа 17-аллилоамино-17-деметокси-ГА (17-AAG) действительно индуцируют синтез Hsp70, причем клетки, обработанные ГА, становятся устойчивыми к действию известного противоопухолевого препарата доксорубицина (Demidenko et al., 2006). Авторы этой и других работ призывают крайне осторожно относиться к побочным эффектам новых терапевтических средств, таких как 17-AAG.

Рассматривая механизмы защитной функции Hsp70, мы не коснулись вопроса о том, зависит ли она от его шаперонной активности. К сожалению, данных, могущих найти связь между этими свойствами белка, довольно мало. В более раннем обзоре мы сослались на работы группы Кампинги, установившие, что при повышении количества Hsp70 процессы агрегации поврежденных вследствие стресса клеток замедляются, и поскольку такая агрегация является причиной гибели клеток, можно утверждать, что уровень апоптоза снижается благодаря эффективности Hsp70 как шаперона (Kampinga, 2006).

Хочется остановиться на двух недавних публикациях. В одной из них авторы использовали модель апоптоза, индуцированного метаболическими ингибиторами, что приводило к связанному с белком Bax повреждению митохондриальных мембран, выходу фактора AIF-1 в цитоплазму и его транспорту в ядро и в конечном счете развитию процесса апоптоза. С использованием разных делеционных и мутантных конструкций Hsp70 удалось установить, что для инактивации AIF-1 в цитоплазме необходимы как весь АТФазный домен, так и последовательность четырех последних С-концевых аминокислот — EEVD (Rushalski et al., 2006). Для остановки транспорта AIF-1 в ядро тетрапептид не нужен. Таким образом, для подавления апоптоза необходим весь АТФазный домен, т. е. наиболее консервативная часть шаперона.

В другой работе, посвященной анализу доменов Hsp70, ответственных за протекцию первичных астроцитов против ишемического повреждения, установлено, что делеции в N-концевой части молекулы белка и соответственно способность к фолдингу других полипептидов не влияют на защитный эффект Hsp70 (Sun et al., 2006). В то же время авторы показали, что ответственность за защитную активность несет С-концевой домен белка. Противоречия с предыдущей работой (Rushalski et al., 2006) относятся, скорее всего, к разнице в способах определения защитной активности и в самих выбранных конструкциях белка. Несмотря на видимые противоречия, из обсуждаемых данных следует, что обе части шаперона (АТФ- и пептидсвязывающая) необходимы для полноправной защитной активности белка Hsp70.

Таким образом, шаперонная и защитная активности Hsp70 связаны друг с другом и составляют основную протекторную систему живой клетки. Существуют препараты и воздействия, позволяющие усилить экспрессию внутриклеточного Hsp70, в настоящее время они рассматриваются в качестве средств для терапии широкого круга патологий.

В последние 10—12 лет собрано значительное число данных, подтверждающих возможность выхода белка Hsp70 на поверхность и(или) во внеклеточное пространство и кровоток. Частично эти работы были инспирированы открытием некоторых Hsp, в основном Hsp70, на наружной мембране раковых клеток. Интерес к комплексу шаперона с мембраной неслучаен, поскольку в дальнейшем такие комплексы стали использоваться для создания противоопухолевых вакцин. В начальных экспериментах препараты мембран раковых клеток вводили животным, а затем инъецировали опухолевые клетки. Протокол оказался успешным: отторжение опухоли было зарегистрировано в моделях значительного числа онкопатологий. При анализе препаратов мембран выяснилось, что наиболее значительную роль в достижении терапевтического эффекта играет наличие Hsp70. Для увеличения эффективности иммунотерапии вместо мембран для иммунизации стали использовать препарат Hsp70, выделенного с использованием разных хроматографических сорбентов, за исключением АТФ-агарозы (Blachere et al., 1993; Castelli et al., 2004). Отметим, что применение этого геля позволяет выделить Hsp70 практически без примесей, которые, как выяснилось, являются опухолевыми антигенами, специфичными для данного типа опухоли. Иммунизация животных перед введением им раковых клеток приводила к отторжению опухоли и генерации иммунного ответа. Эти результаты послужили основой для разработки способов иммунотерапии с использованием Hsp70 и других Hsp и регулируемых глюкозой белков в качестве эффективного адъюванта. Во-первых, группа под руководством П. Сривастава начала получать препараты Hsp70 и Grp96 непосредственно из опухолей пациентов и иммунизировать их такими препаратами; в результате у больных воз-

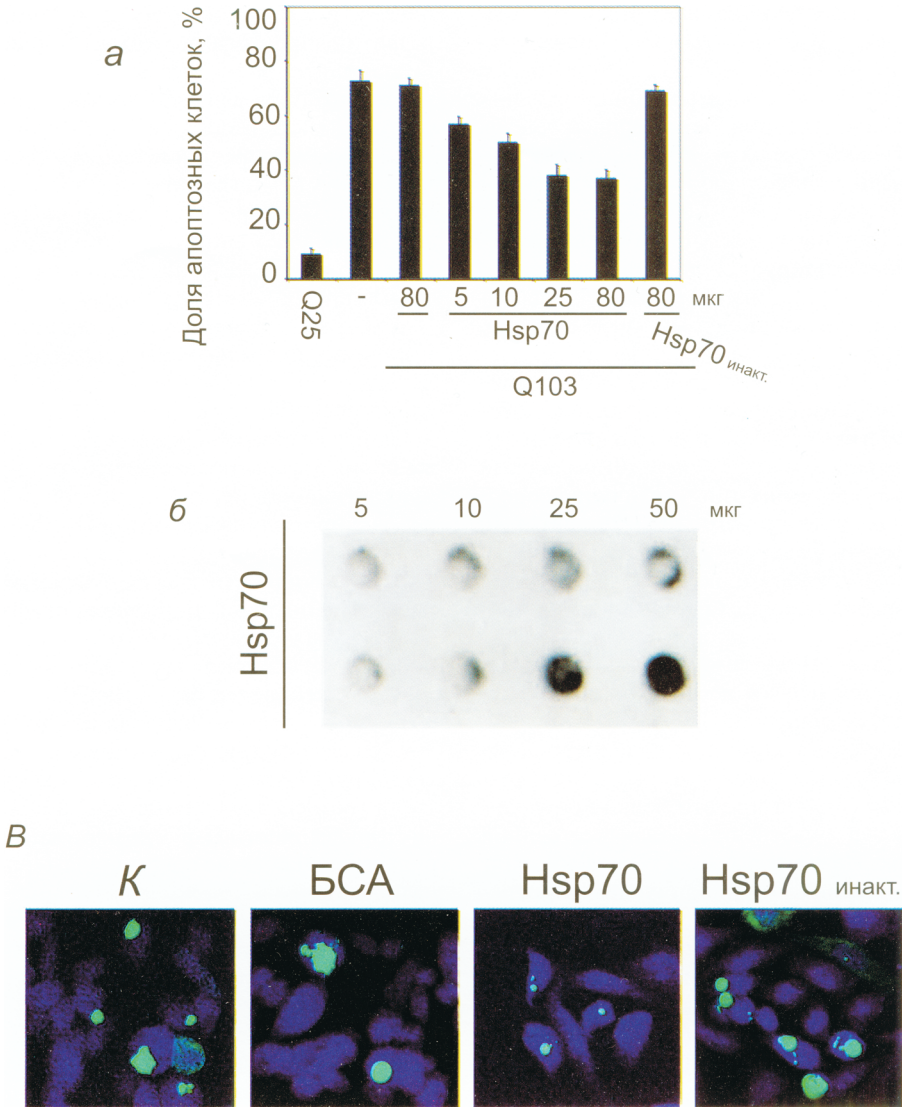

Рис. 3. Добавленный извне Hsp70 способен проникать в клетки и защищать их от нейротоксического действия агрегатов мутантного хантингтина, основного патогена при хорее Гентингтона.

а — клетки нейробластомы SK-N-SH, имитирующие болезнь Гентингтона и инкубирующиеся с препаратом, очищенным Hsp70, становятся устойчивыми к индуцирующему апоптоз действию агрегатов мутантного хантингтина; эта устойчивость зависит от дозы вносимого в культуру белка и не проявляется при введении в среду контрольного белка БСА (80 мкг/мл) или термоденатурированного Hsp70. *б* — данные ультрафильтрации показывают, что причиной снижения уровня смертности клеток является уменьшение размеров агрегатов, что приводит к их прохождению через фильтр (*верхний ряд*); БСА, взятый в тех же дозах, подобного эффекта не оказывает (*нижний ряд*). *в* — данные микроскопии подтверждают, что введение в культуру клеток, экспрессирующих мутантный хантингтин, Hsp70, но не денатурированного шаперона или сывороточного альбумина приводит к падению числа клеток с агрегатами и снижению размеров последних. *К* — контроль.

никал иммунный ответ к собственным опухолевым антигенам, что блокировало дальнейшее распространение опухоли (Blachere et al., 1993). По крайней мере для отдельных типов опухолей, таких как рак почки, методика иммунотерапии с использованием Grp96 признана успешной. В апреле 2008 г. она была сертифицирована в РФ компанией Antigenics (США) и, таким образом, стала одной из первых зарегистрированных технологий индивидуальной противоопухолевой терапии (http//www.antigenics.com). Добавим, что только в Американском патентном офисе зарегистрировано более 100 патентов на различные способы получения препаратов Hsp70 для иммунизации онкологических больных, и значительная их часть находится на контроле у FDA — администрации по контролю за продуктами питания и лекарствам при правительстве США.

Другим направлением, формирование которого началось после открытия белка Hsp70 на поверхности раковых клеток, стало исследование поведения клеток, нацеленных на распознавание комплекса шаперона с опухолевыми антигенами. Выяснилось, что для части цитотоксических клеток, натуральных киллеров, мишенью является пептид Hsp70 длиной 14 аминокислот и расположенный в мембране раковой клетки (Gastpar et al., 2004). В 1-й фазе клинических испытаний этот пептид показал свою эффективность в применении к пациентам с раком кишечника или легких (Krause et al., 2004). Считается установленным, что ответ на комплекс Hsp70 с опухолевыми антигенами, экспонированный на поверхности раковых клеток, может также обеспечиваться цитотоксическими лимфоцитами. Подтверждений этому в литературе много: есть работы, указывающие на участие $CD8^+$-

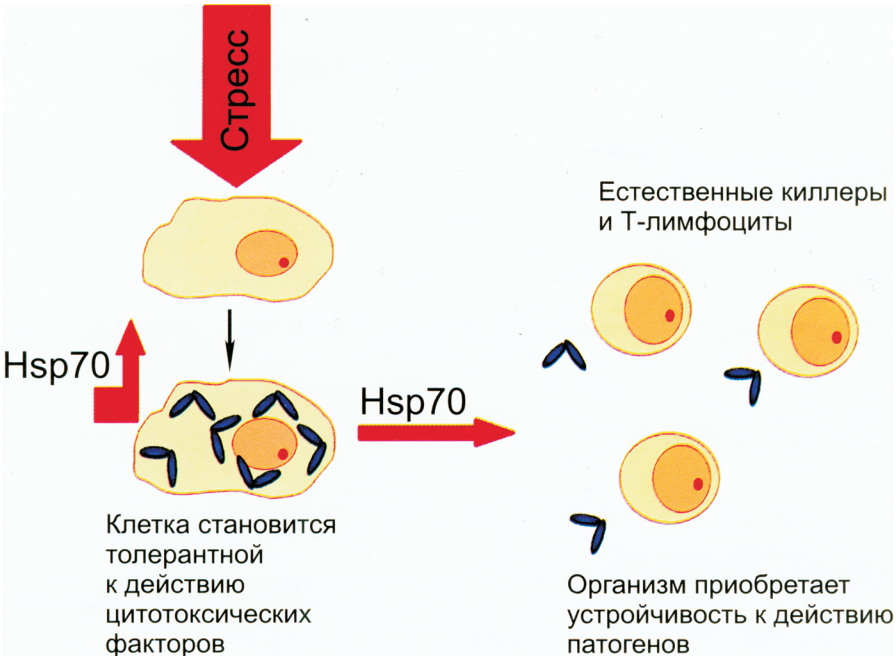

Рис. 4. Двойственная функция Hsp70 в клетке и организме.

Повышение уровня Hsp70 в клетке делает ее устойчивой к широкому кругу цитотоксических факторов. Кроме увеличения содержания внутриклеточного шаперона стресс способен индуцировать выход Hsp70 на клеточную поверхность или вообще во внеклеточное пространство. Экзогенный белок способен активировать функцию многих клеток иммунной системы, включая естественные киллеры и Т-клетки, и, таким образом, увеличивать толерантность уже всего организма к патогенным и повреждающим факторам. Защитная функция характерна для Hsp70 внутри и вне клетки, но механизмы ее видимо различаются.

лимфоцитов в ответе организма, спровоцированном препаратами, обогащенными Hsp70 и другими Hsp. В число таких препаратов входят мембраны, выделенные из опухолевых клеток, экзосомы, полученные из гретых опухолевых клеток (Dai et al., 2005), экстракты клеток с повышенной экспрессией Hsp70 (Huang et al., 2004) и непосредственно комплексы Hsp70—антигенный пептид или смесь пептидов (Flechtner et al., 2006). Есть данные, показывающие, что презентация опухолевых антигенов антигенпрезентирующим клеткам может эффективно проводиться суммарным препаратом шаперонов (Kislin et al., 2007). Наконец становится очевидным, что очищенный Hsp70 может также представлять пептиды дендритным и В-клеткам; поэтому препараты шаперона можно использовать для индукции антиген-специфического иммунитета к опухолевым клеткам (Bendz et al., 2007).

Подобно опухолевым антигенам Hsp70 может манипулировать с вирусными и бактериальными белками и пептидами. И в этом случае шаперон может представлять вирусные антигены антигенпрезентирующим клеткам и способствовать созреванию дендритных клеток. Было установлено, что комплекс Hsp70 с вирусными или бактериальными белками активирует обе ветви иммунной системы — клеточную и гуморальную. Такая же идеология, как и в случае с опухолевыми антигенами, используется для построения схем иммуномодуляции с помощью Hsp70. Например, введение очищенного шаперона мышам перед индукций лейшманиоза оказалось достаточным для повышения В-клеточного ответа, причем авторы показали, что Hsp70 стимулирует мощную реакцию гуморальной системы также и в образцах от пациентов (Rafati et al., 2007).

Завершая этот раздел, можно утверждать, что выходящий на поверхность раковых или инфицированных клеток Hsp70 образует комплекс с антигенами, который затем поглощается и далее представляется антигенпрезентирующими клетками; при этом часто активируются обе ветви иммунной системы — клеточная и гуморальная.

В конце 1990-х годов начало развиваться направление, связанное с «экзогенным», выходящим из клеток шапероном Hsp70. Начало этому было положено в работе Тайтелла с соавторами, показавшими высвобождение белка из глии кальмара и его переход в нейрон (Tytell et al., 1986). Через 15 лет нам удалось воспроизвести этот эффект в экспериментах с клетками (Guzhova et al., 2001) и после этого в результате исследований, проведенных несколькими группами, удалось сформулировать несколько основных принципов экспорта белка клетками.

Во-первых, число факторов, стимулирующих выход Hsp70 из клеток во внеклеточное пространство и кровоток, достаточно ограниченно. К ним относят тепловой шок (Guzhova et al., 2001; Evdonin et al., 2006), специфический ингибитор фосфолипазы С (Evdonin et al., 2004), тяжелую физическая нагрузку (Walsh et al., 2001), умеренную гипоксию, психоэмоциональный стресс, модель хищник и жертва (Fleshner et al., 2004) и некоторые другие. Во-вторых, установлено, что не все клетки способны экспортировать Hsp70; к числу наиболее реальных «экспортеров» относятся моноциты (Hunter-Lavin et al., 2004) и клетки печени; примечательно, что выход Hsp70 в кровоток, спровоцированный физической нагрузкой и стрессом, определяется также функцией адренергических рецепторов (Lancaster, Febbraio, 2005). В-третьих, в результате исследования возможных механизмов выхода шаперона из клеток установлено сразу несколько таких систем от экзосом до липидных рафтов. Не вдаваясь в рассуждения о реально действующих механизмах секреции шаперона, сошлемся на недавние обзоры (Johnson,

Fleshner, 2006; Calderwood et al., 2007). По-видимому, существенный вклад в то, каким образом происходит высвобождение Hsp70, вносят происхождение самих клеток и функциональные особенности их экспортных механизмов. Представляется, что надежными производителями экзогенного белка должны быть те ткани и клетки, в которых его уровень высок. В качестве примера можно привести миокард человека (Demidov et al., 1999) и медленную красную мышцу быка (Guerriero et al., 1989).

Наибольший интерес в данных об экзогенном Hsp70 вызывает его функция во внеклеточном матриксе или кровотоке. В этой области наиболее известной стала работа, результаты которой показали, что шаперон может вызывать продукцию провоспалительных цитокинов, интерлейкинов-2 и -6 и фактора некроза опухолей в макрофагах (моноцитах) через активацию рецептора CD14 и системы белков транскрипционного фактора NF-kappaB (Asea et al., 2000). Позднее эти авторы опубликовали данные о том, что экзогенный Hsp70 активирует тот же сигнальный каскад, но опосредованным через рецепторы системы врожденного иммунитета TLR2/4 образом (Asea et al., 2002). Эти данные позволили авторам сделать вывод о двойственной функции белка, выступающего в качестве шаперона и цитокина; чтобы подчеркнуть эту двойственность, Hsp70 назвали шаперокином. К настоящему времени определены рецепторные структуры, которые на клетках разного происхождения способны активировать выходящий во внеклеточное пространство Hsp70; в их число попали рецепторы CD91, CD40, Lox-1 и так называемые скавенджер-рецепторы (Calderwood et al., 2007).

Нацеленность экзогенного Hsp70 на рецепторные структуры клеток, составляющих систему врожденного и приобретенного иммунитета, объясняет влияние белка на физиологию организма. Наиболее типичным полезным влиянием экзогенного Hsp70 является повышение толерантности к бактериальной инфекции, которое сопровождает все описанные выше атрибуты воспалительной реакции, индуцируемые белком. Следует отметить, что такие эффекты экзогенного шаперона описаны для ситуаций, когда его выход в кровоток провоцируется каким-либо из перечисленных выше внешних факторов (Johnson, Fleshner, 2006) или введением в препарат белка в клеточную культуру.

В течение последних лет нам удалось продемонстрировать несколько терапевтических эффектов препаратов Hsp70, и один из наиболее ярких основан на использовании модели хореи Гентингтона (БГ) in vitro. Эта болезнь на молекулярном уровне характеризуется появлением в гене хантингтина аномально длинных последовательностей глутамина, которые вырезаются из молекул белка и образуют нерастворимые агрегаты; эти агрегаты обладают высокой токсичностью, и клетки, в которых они формируются, погибают. В модели БГ клетки, трансфицированные мутантным геном хантингтина и обработанные нейтральным белком, погибают по апоптозному механизму (Novoselova et al., 2005). Если к культуре тех же клеток в определенное время добавить препарат Hsp70, то число клеток, содержащих агрегаты, уменьшается, так же как и их размеры, что естественно приводит к снижению уровня апоптоза в клеточной популяции (рис. 3).

Другой пример получен в экспериментах на модели эпилепсии. В этой модели у животных, предрасположенных к аудиогенным судорогам, вызывали гиперактивацию глутаматных рецепторов типа NMDA. Предварительное введение препарата Hsp70 в 3-й желудочек мозга приводило к существенному уменьшению длительности и тяжести моторных судорог и симптомов атаксии и стереотипии (Екимова и др., 2008).

Таким образом, на молекулярном уровне шаперон Hsp70 играет двойственную роль, определяя судьбу поврежденных стрессом или мутантных полипептидов: продолжить ли им жизнь в клетке или удалить их. Видимо, на шаперонной активности основана защитная функция белка, распространяющаяся на клетки различного происхождения и на целые организмы. Принцип повышения уровня Hsp70—увеличение устойчивости клетки работает практически без исключений (рис. 4). Определенное количество стрессовых факторов способно влиять на клеточные системы экспорта белков, и тогда Hsp70 выходит во внеклеточное пространство, где он, активируя клетки, составляющие системы врожденного и приобретенного иммунитета, способен защищать уже весь организм от патогенов и травм. Безусловно, эти свойства шаперона должны и уже находят применение в разработке различных терапевтических стратегий. В этом плане большие перспективы имеются у веществ, способных вызвать повышение экспрессии гена, например основного компонента красного вина, резвератрола. Более того, разрабатываются диеты, способствующие усилению экспрессии гена шаперона (Marotta et al., 2007), что в перспективе должно, как считают авторы другой работы, дать надежду на продление жизни; эти авторы определили белки теплового шока, в особенности Hsp70, как вакцину против старения (Davidovic et al., 2007).

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального центра научно-технических программ (ГК № 02.512.11.2249) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-01392).

Список литературы

Гужова И. В., *Новоселов С. С.*, *Маргулис Б. А. 2005.* Шаперон Hsp70 и перспективы его использования в противоопухолевой терапии. Цитология. 47 (3) : 187—199.

Екимова И. В., *Комарова Т. Г.*, *Ницинская Л. Е.*, *Пастухов Ю. Ф.*, *Гужова И. В. 2008.* Эффекты экзогенного белка теплового шока 70 кДа и кверцетина на NMDA-индуцированные судороги. Докл. РАН. 418 (5) : 705—708.

Маргулис Б. А., *Гужова И. В. 2000.* Белки стресса в эукариотической клетке. Цитология. 42 (4) : 323—342.

Чеботарева Н. А., *Курганов Б. И.*, *Ливанова Н. Б. 2004.* Биохимические эффекты молекулярного краудинга. Биохимия. 69 (11) : 1522—1536.

Afanasyeva E. A., *Komarova E. Yu.*, *Larsson L.-G.*, *Bahram F.*, *Margulis B. A.*, *Guzhova I. V. 2007.* Drug-induced Myc-mediated apoptosis of cancer cells is inhibited by stress protein Hsp70. Int. J. Cancer. 121 : 2615—2621.

Akerfelt M., *Trouillet D.*, *Mezger V.*, *Sistonen L. 2007.* Heat shock factors at a crossroad between stress and development. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1113 : 15—27.

Alberti S., *Esser C.*, *Höhfeld J. 2003*. BAG-1 — a nucleotide exchange factor of Hsc70 with multiple cellular functions. Cell Stress Chaperones. 8 : 225—231.

Asea A., *Kraeft S. K.*, *Kurt-Jones E. A.*, *Stevenson M. A.*, *Chen L. B.*, *Finberg R. W.*, *Koo G. C.*, *Calderwood S. K. 2000.* HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. Nat. Med. 6 : 435—442.

Asea A., *Rehli M.*, *Kabingu E.*, *Boch J. A.*, *Bare O.*, *Auron P. E.*, *Stevenson M. A.*, *Calderwood S. K. 2002.* Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. J. Biol. Chem. 277 : 15 028—15 034.

Bendz H., Ruhland S. C., Pandya M. J., Hainzl O., Riegelsberger S., Braüchle C., Mayer M. P., Buchner J., Issels R. D., Noessner E. 2007. Human heat shock protein 70 enhances tumor antigen presentation through complex formation and intracellular antigen delivery without innate immune signaling. J. Biol. Chem. 282 : 31 688—31 702.

Bivik C., Rosdahl I., Ollinger K. 2007. Hsp70 protects against UVB induced apoptosis by preventing release of cathepsins and cytochrome *c* in human melanocytes. Carcinogenesis. 28 : 537—544.

Blachere N. E., Udono H., Janetzki S., Li Z., Heike M., Srivastava P. K. 1993. Heat shock protein vaccines against cancer. J. Immunother. 14 : 352—356.

Brown I. R. 2007. Heat shock proteins and protection of the nervous system. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1113 : 147—158.

Calderwood S. K., Mambula S. S., Gray P. J., Jr. 2007. Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1113 : 28—39.

Castelli C., Rivoltini L., Rini F., Belli F., Testori A., Maio M., Mazzaferro V., Coppa J., Srivastava P. K., Parmiani G. 2004. Heat shock proteins: biological; functions and clinical applications as personalized vaccines for human cancer. Cancer Immunol. Immunother. 53 : 227—233.

Chen H., Liu Z., Zhou Z., Jiang M., Qian L., Wu S. 2003. The regulatory effect of memantine on expression and synthesis of heat shock protein 70 gene in neonatal rat models with cerebral hypoxic ischemia. Chin. Med. J. (Engl.). 116 : 558—564.

Dai S., Wan T., Wang B., Zhou X., Xiu F., Chen T., Wu Y., Cao X. 2005. More efficient induction of HLA-A*0201-restricted and carcinoembryonic antigen (CEA)-specific CTL response by immunization with exosomes prepared from heat-stressed CEA-positive tumor cells. Clin. Cancer Res. 11 : 7554—7563.

Davidovic M., Milosevic D. P., Despotovic N., Sekularac N., Erceg P. 2007. Is there such thing as «vaccine against aging»? Adv. Gerontol. 20 : 56—59.

Demidenko Z. N., Vivo C., Halicka H. D., Li C. J., Bhalla K., Broude E. V., Blagosklonny M. V. 2006. Pharmacological induction of Hsp70 protects apoptosis-prone cells from doxorubicin: comparison with caspase-inhibitor- and cycle-arrest-mediated cytoprotection. Cell Death Differ. 13 : 1434—1441.

Demidov O. N., Tyrenko V. V., Svistov A. S., Komarova Y. Y., Karpishenko A. I., Margulis B. A., Shevchenko Y. L. 1999. Heat shock proteins in cardiosurgery patients. Eur. J. Cardiothoraic Surg. 16 : 444—449.

Ellis J. 1987. Proteins as molecular chaperones. Nature. 328 : 378—379.

Evdonin A. L., Guzhova I. V., Margulis B. A., Medvedeva N. D. 2004. Phospholipase c inhibitor, u73122, stimulates release of hsp-70 stress protein from A431 human carcinoma cells. Cancer Cell. Intern. 4 : 2.

Evdonin A. L., Guzhova I. V., Margulis B. A., Medvedeva N. D. 2006. Extracellular heat shock protein 70 mediates heat stress-induced epidermal growth factor receptor transactivation in A431 carcinoma cells. FEBS Lett. 580 : 6674—6678.

Flechtner J. B., Cohane K. P., Mehta S., Slusarewicz P., Leonard A. K., Barber B. H., Levey D. L., Andjelic S. 2006. High-affinity interactions between peptides and heat shock protein 70 augment CD8+ T lymphocyte immune responses. J. Immunol. 177 : 1017—1027.

Fleshner M., Campisi J., Amiri L., Diamond D. M. 2004. Cat exposure induces both intra- and extracellular Hsp72: the role of adrenal hormones. Psychoneuroendocrinology. 29 : 1142—1152.

Gastpar R., Gross C., Rossbacher L., Ellwart J., Riegger J., Multhoff G. 2004. The cell surface-localized heat shock protein 70 epitope TKD induces migration and cytolytic activity selectively in human NK cells. J. Immunol. 172 : 972—980.

Giffard R. G., Han R. Q., Emery J. F., Duan M., Pittet J. F. 2008. Regulation of apoptotic and inflammatory cell signaling in cerebral ischemia: the complex roles of heat shock protein 70. Anesthesiology. 109 : 339—348.

Guerriero V., Jr., Raynes D. A., Gutierrez J. A. 1989. HSP70-related proteins in bovine skeletal muscle. J. Cell. Physiol. 140 : 471—477.

Guzhova I., Kislyakova K., Moskaliova O., Fridlanskaya I., Tytell M., Cheetham M., Margulis B. 2001. In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance. Brain Res. 914 : 66—73.

Hartl F. U., Hayer-Hartl V. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. Science. 295 : 1852—1858.

Hartmann-Petersen R., Seeger M., Gordon C. 2003. Transferring substrates to the 26S proteasome. Trends Biochem. Sci. 28 : 26—31.

Huang C., Yu H., Wang Q., Ma W., Xia D., Yi P., Zhang L., Cao X. 2004. Potent antitumor effect elicited by superantigen-linked tumor cells transduced with heat shock protein 70 gene. Cancer Sci. 95 : 160—167.

Hunter-Lavin C., Davies E. L., Bacelar M. M., Marshall M. J., Andrew S. M., Williams J. H. 2004. Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 324 : 511—517.

Jackson P. K., Eldridge A. G., Freed E., Furstenthal L., Hsu J. Y., Kaiser B. K., Reimann J. D. 2000. The role of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. Trends Cell Biol. 10 : 429—439.

Johnson J. D., Fleshner M. 2006. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. J. Leukoc. Biol. 79 : 425—434.

Kalmar B., Novoselov S., Gray A., Cheetham M. E., Margulis B., Greensmith L. 2008. Late stage treatment with Arimoclomol delays disease progression and prevents protein aggregation in the SOD1(G93A) mouse model of ALS. J. Neurochem. Sep 2. 107 : 339—350.

Kampinga H. H. 2006. Chaperones in preventing protein denaturation in living cells and protecting against cellular stress. Handb. Exp. Pharmacol. 172 : 1—42.

Kanitkar M., Bhonde R. R. 2008. Curcumin treatment enhances islet recovery by induction of heat shock response proteins, Hsp70 and heme oxygenase-1, during cryopreservation. Life Sci. 82 : 182—189.

Kislin K. L., Marron M. T., Li G., Graner M. W., Katsanis E. 2007. Chaperone-rich cell lysate embedded with BCR-ABL peptide demonstrates enhanced anti-tumor activity against a murine BCR-ABL positive leukemia. FASEB J. 21 : 2173—2184.

Komarova E. Yu., Afanasyeva E. A., Bulatova M. M., Cheetham M. E., Margulis B. A., Guzhova I. V. 2004. Downstream caspases are novel targets for the anti-apoptotic activity of the molecular chaperone Hsp70. Cell Stress Chaperones. 9 : 38—48.

Krause S. W., Gastpar R., Andreesen R., Gross C., Ullrich H., Thonigs G., Pfister K., Multhoff G. 2004. Treatment of colon and lung cancer patients with *ex vivo* heat shock protein 70-peptide-activated, autologous natural killer cells: a clinical phase trial. Clin. Cancer Res. 10 : 3699—3707.

Lancaster G. I., Febbraio M. A. 2005. Mechanisms of stress-induced cellular HSP72 release: implications for exercise-induced increases in extracellular HSP72. Exerc. Immunol. Rev. 11 : 46—52.

Lui J. C., Kong S. K. 2007. Heat shock protein 70 inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor to avoid DNA fragmentation in TF-1 cells during erythropoiesis. FEBS Lett. 581 : 109—117.

Marotta F., Koike K., Lorenzetti A., Naito Y., Fayet F., Shimizu H., Marandola P. 2007. Nutraceutical strategy in aging: targeting heat shock protein and inflammatory profile through understanding interleukin-6 polymorphism. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1119 : 196—202.

Matsumori Y., Northington F. J., Hong S. M., Kayama T., Sheldon R. A., Vexler Z. S., Ferriero D. M., Weinstein P. R., Liu J. 2006. Reduction of caspase-8 and -9 cleavage is associated with increased c-FLIP and increased binding of Apaf-1 and Hsp70 after neonatal hypoxic/ischemic injury in mice overexpressing Hsp70. Stroke. 37 : 507—512.

Novoselova T. V., Margulis B. A., Novoselov S. S., Sapozhnikov A. M., Van Der Spuy J., Cheetham M. E., Guznova I. V. 2005. Treatment with extracellular HSP70/HSC70 protein can reduce po-

lyglutamine toxicity and aggregation. J. Neurochem. 94 : 597—606.

Nylandsted J., Gyrd-Hansen M., Danielewicz A., Fehrenbacher N., Lademann U., Hoyer-Hansen M., Weber E., Multhoff G., Rohde M., Jäättelä M. 2004. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. J. Exp. Med. 200 : 425—435.

Nylandsted J., Rohde M., Brand K., Bastholm L., Elling F., Jäättelä M. 2000. Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 97 : 7871—7876.

Pan T., Li X., Xie W., Jankovic J., Le W. 2005. Valproic acid-mediated Hsp70 induction and anti-apoptotic neuroprotection in SH-SY5Y cells. FEBS Lett. 579 : 6716—6720.

Rafati S., Gholami E., Hassani N., Ghaemimanesh F., Taslimi Y., Taheri T., Soong L. 2007. Leishmania major heat shock protein 70 (HSP70) is not protective in murine models of cutaneous leishmaniosis and stimulates strong humoral responses in cutaneous and visceral leishmaniosis patients. Vaccine. 25 : 4159—4169.

Ren M., Senatorov V. V., Chen R. W., Chuang D. M. 2003. Postinsult treatment with lithium reduces brain damage and facilitates neurological recovery in a rat ischemia/reperfusion model. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100 : 6210—6215.

Ruchalski K., Mao H., Li Z., Wang Z., Gillers S., Wang Y., Mosser D. D., Gabai V., Schwartz J. H., Borkan S. C. 2006. Distinct hsp70 domains mediate apoptosis-inducing factor release and nuclear accumulation. J. Biol. Chem. 281 : 7873—7880.

Steel R., Doherty J. P., Buzzard K., Clemons N., Hawkins C. J., Anderson R. L. 2004. Hsp72 inhibits apoptosis upstream of the mitochondria and not through interactions with Apaf-1. J. Biol. Chem. 279 : 51 490—51 499.

Sun Y., Ouyang Y. B., Xu L., Chow A. M., Anderson R., Hecker J. G., Giffard R. G. 2006. The carboxyl-terminal domain of inducible Hsp70 protects from ischemic injury *in vivo* and *in vitro.* J. Cereb. Blood Flow Metab. 26 : 937—950.

Tytell M., Greenberg S. G., Lasek R. J. 1986. Heat shock-like protein is transferred from glia to axon. Brain Res. 363 : 161—164.

Walsh R. C., Koukoulas I., Garnham A., Moseley P. L., Hargreaves M., Febbraio M. A. 2001. Exercise increases serum Hsp72 in humans. Cell Stress Chaperones. 6 : 386—393.

Westerheide S. D., Bosman J. D., Mbadugha B. N., Kawahara T. L., Matsumoto G., Kim S., Gu W., Devlin J. P., Silverman R. B., Morimoto R. I. 2004. Celastrols as inducers of the heat shock response and cytoprotection. J. Biol. Chem. 279 : 56 053—56 060.

Young J. C., Agashe V. R., Siegers K., Hartl U. 2004. Pathways of chaperone mediated protein folding in the cytosol. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 5 : 781—791.

Zeiner M., Gebauer M., Gehring U. 1997. Mammalian protein RAP46: an interaction partner and modulator of 70 kDa heat shock proteins. EMBO J. 16 : 5483—5490.

Zhang Y. Q., Sarge K. D. 2007. Celastrol inhibits polyglutamine aggregation and toxicity though induction of the heat shock response. J. Mol. Med. 85 : 1421—1428.

Поступила 7 X 2008

DUAL ROLE OF CHAPERONES IN THE RESPONSE OF A CELL AND OF A WHOLE ORGANISM TO STRESS

B. A. Margulis, I. V. Gushova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; e-mail: margulis@cytspb.rssi.ru

Chaperones constitute a class of proteins able to recognize newly synthesized and(or) damaged polypeptides and to transport these to the sites of their allocation or promote the degradation of irreversibly spoiled ones. The members of Hsp70 family can be classified as the first-discovered chaperones, and to date the chaperonic mechanism based on the proteins is well understood. Using this mechanism Hsp70 executes the dual role: it corrects the structure of nascent and damaged polypeptides or promotes degradation of incorrigible polypeptides. Chaperonic activity appears to form key functions of Hsp70, protective and adjuvant ones. The former is proved in a large amount of experiments both *in vitro* and *in vivo*. From the beginning of the 2000th, it has become clear that Hsp70 can be released by cells treated by a number of stressful factors, and exogenous chaperone can influence the cells of innate immunity system proving that the protein uses its protective power already at a level of the whole organism. One of the goals of this review is to describe the functions performed by Hsp70 inside and outside a cell. In a view of its properties Hsp70 can be of significant interest for creation of novel therapeutic technologies. This direction to the practical application of the chaperone is also considered in the review.

Key words: heat shock protein, chaperones, cancer, neurodegenerative disease.