

УДК 577.322.52

## СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВИРУСНЫХ ШАПЕРОНИНОВ

### Обзор

© 2022 Л.П. Курочкина<sup>1\*</sup>, П.И. Семенюк<sup>1</sup>, О.С. Соколова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: lpk56@mail.ru

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биоинженерии, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 16.11.2021

После доработки 06.12.2021

Принята к публикации 06.12.2021

Шаперонины обеспечивают правильное сворачивание (фолдинг) белков *in vivo* и *in vitro* и, как считалось до недавнего времени, свойственны прокариотам, эукариотам и археям. Однако оказалось, что и некоторые вирусы бактерий (бактериофаги) кодируют собственные шаперонины. В данном обзоре представлены результаты исследований первых представителей этой новой группы шаперонинов: двухкольцевого шаперонина E1 и однокольцевых шаперонинов OBP и AR9. Проведен сравнительный анализ биохимических свойств и структуры фаговых шаперонинов между собой и с другими известными шаперонинами I и II групп.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** шаперонин, бактериофаг, пространственная структура, криоэлектронная микроскопия, кристаллография.

DOI: 10.31857/S032097252201002X

### ВВЕДЕНИЕ

Сворачивание (фолдинг) многих белков с образованием уникальной нативной структуры возможно только при участии молекулярных шаперонов [1–5]. Одним из наиболее изученных классов молекулярных шаперонов являются шаперонины, которые встречаются во всех царствах живой природы. Они помогают правильно сворачиваться как новосинтезированным полипептидным цепям, так и денатурированным под воздействием стресса белкам за счет энергии гидролиза АТФ [6]. Нарушение функций шаперонинов приводит к нарушению сворачивания белков, участвующих в широком спектре клеточных процессов. Патогенные мутации или абберрантные посттрансляционные модификации, влияющие на структуру и функцию шаперонинов, вызывают так называемые шаперонинопатии [7]. Это, в свою очередь, может повлиять на большинство жизненно важных процессов, происходящих на уровне всего организма, и стать причиной онкологических, аутоиммунных, нейродегенеративных заболева-

ний, включая болезни Альцгеймера и Паркинсона, и других патологических состояний [8–10].

Шаперонины – очень консервативные белки, имеющие характерную архитектуру (рис. 1). Они, как правило, состоят из двух состыкованных «спина к спине» колец, каждое из которых содержит 7–9 субъединиц (молекулярная масса отдельных субъединиц составляет около 60 кДа), образующих полый бочонок, внутри которого и происходит сворачивание белков-субстратов. Шаперонины принято делить на две группы (таблица). К группе I относятся шаперонины прокариот (в частности, наиболее изученный GroEL *Escherichia coli*) и эукариотических органелл – митохондрий (Hsp60) и хлоропластов (Cpn60) [11–13]. К группе II относятся шаперонины цитозоля архей (термосома) и эукариот (TRiC/CCT) [14]. Шаперонины I группы являются гомоолигомерными комплексами, содержащими по 7 субъединиц в каждом кольце. Шаперонины II группы чаще всего представляют собой гетероолигомеры, кольца которых состоят из 8 или 9 различных, но гомологичных субъединиц. Кольца шаперонинов различаются взаимным расположением субъединиц: у шаперонинов I группы каждая субъединица одного кольца взаимодействует с двумя субъединицами

\* Адресат для корреспонденции.

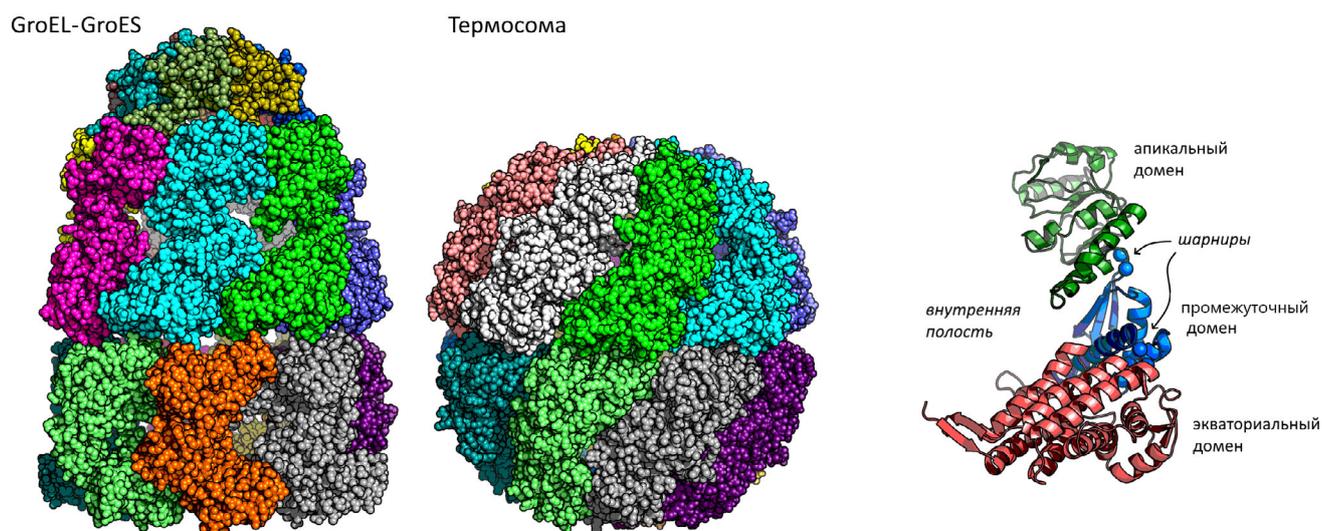
Сравнение вирусных шаперонинов с шаперонинами I и II групп

Локализация	Группа I			Группа II		Вирусные шаперонины	
	бактерии	митохондрии	хлоропласты	археи	цитозоль эукариот	бактериофаги	
Название	GroEL	Hsp60	Cpn60	термосома	TRiC (CCT)	EL	OBP, AR9
Кошаперонин	GroES	Hsp10	Cpn10/20	—	—	—	—
Количество типов субъединиц	1	1	2	2 или 3	8	1	1
Олигомеризация	2 × 7	2 × 7	2 × 7	2 × 8 или 2 × 9	2 × 8	2 × 7	1 × 7
Расположение субъединиц между кольцами	1 : 2	1 : 2	1 : 2	1 : 1	1 : 1	1 : 1	—

противоположного кольца (1 : 2), а у шаперонинов II группы каждая субъединица одного кольца взаимодействует только с одной субъединицей другого (1 : 1). Однако главным отличием между шаперонинами двух групп является то, что шаперонины I группы функционируют в паре с другими белками, кошаперонинами: GroES – в бактериях, Hsp10 – в митохондриях и Cpn10/20 – в хлоропластах [15–17]. Кошаперонины состоят из 7 идентичных субъединиц (масса субъединицы около 10 кДа; у хлоропластов встречаются кошаперонины с массой субъединиц около 20 кДа) и имеют куполообразную форму. В процессе функционирования кошаперонин как «крышка» закрывает с торца внутреннюю полость шаперонина, в которой происходит сворачивание белка. Шаперонины II груп-

пы функционируют без кошаперонинов: роль «крышки» у них выполняют встроенные в апикальные домены длинные альфа-спирали, которые меняют свое положение на разных стадиях реакционного цикла, тем самым открывая или закрывая внутреннюю полость [18, 19]. На основании структурных и биохимических исследований установлено, что в реакционном цикле шаперонины I и II групп претерпевают АТФ-зависимые переходы между открытой и закрытой конформациями.

Специфика масштабных конформационных перестроек, происходящих в процессе функционирования шаперонинов, обусловлена структурой их субъединиц (рис. 1). У шаперонинов обеих групп каждая субъединица состоит из трех доменов: апикального, который распознает и



**Рис. 1.** Кристаллические структуры комплекса GroEL–GroES (группа I) и термосомы (группа II); коды PDB: 1a0n и 1ab6 соответственно; субъединицы окрашены разными цветами; справа – трехдоменная организация субъединицы GroEL

связывает субстрат (а у шаперонинов I группы — еще и кошаперонин); экваториального, который содержит АТР-связывающий сайт и ответственен за внутри- и межкольцевые контакты субъединиц; и промежуточного, соединяющего два вышеупомянутых домена. Промежуточный домен обеспечивает передачу конформационных изменений, инициированных связыванием нуклеотида, от экваториального домена к апикальному [20, 21].

## ФИЛОГЕНИЯ ФАГОВЫХ ШАПЕРОНИНОВ

Шаперонины были открыты в 1970-х годах, когда в процессе генетических исследований различных штаммов *E. coli* был идентифицирован ген, мутации в котором влияли на способность клеток поддерживать рост бактериофагов [22–25]. Продукт этого бактериального гена назвали шаперонином GroEL. Было установлено, что ряд бактериофагов, лямбда, T5, PRD1, Mu и другие, для сборки белков капсида или/и хвоста использует клеточную систему шаперонинов GroEL–GroES [26–29]. У некоторых фагов функцию кошаперонина выполняют их собственные белки, ортологи GroES: например, в фаге T4 — продукт гена (gene product, gp) 31 [30], а в фаге RB49 — SocO [31]. Более того, оказалось, что бактериофаги могут кодировать и собственные шаперонины. Так, ген, кодирующий гомолог GroEL, был впервые обнаружен в 2005 г. в геноме гигантского бактериофага EL *Pseudomonas aeruginosa* [32]. Позже гены, кодирующие GroEL-подобные белки, были найдены у других фагов, и число таких белков-кандидатов, потенциально являющихся шаперонинами, растет по мере депонирования в базу данных GenBank последовательностей геномной ДНК новых бактериофагов [33–36].

Как показал анализ метагеномных последовательностей из различных популяций вириопланктона, литические и умеренные бактериофаги, несущие гены шаперонинов, сравнительно широко распространены в морских экосистемах [37]. Многие из этих бактериофагов кодируют гомологи GroEL и GroES, а часть бактериофагов кодирует только GroEL-подобные шаперонины. По своей последовательности эти шаперонины значительно отличаются от последовательностей бактериальных шаперонинов, из чего следует, что бактериофаги несут этот ген в течение длительного эволюционного времени. Интересно также, что у некоторых бактериофагов были найдены потенциальные шаперонины, филогенетически близкие к термосомам архей, а не шаперонинам I группы, что может являться

указанием на давние эволюционные взаимосвязи между хвостатыми бактериофагами и вирусами архей.

Биоинформатический анализ ряда GroEL-подобных белков, предсказанных на основе известных к настоящему времени последовательностей геномов бактериофагов, показал, что подобно всем известным шаперонинам они имеют трехдоменную организацию и содержат в целом консервативный сайт связывания АТР, который больше похож на нуклеотид-связывающий сайт шаперонинов I группы. Кроме того, аминокислотные последовательности этих белков, как и шаперонинов I группы, не содержат в апикальном домене дополнительной спиральной вставки — встроенной «крышки», характерной для представителей II группы [38]. На эволюционную близость фаговых шаперонинов к шаперонинам I группы указывает также их расположение на филогенетическом древе (рис. 2) [39]. Однако у них имеются и некоторые отличия: в частности, аминокислотные остатки, которые по аналогии с бактериальным GroEL отвечают за межкольцевые взаимодействия субъединиц, не консервативны у предсказанных фаговых шаперонинов. Необходимо также отметить, что фаговые шаперонины нельзя объединить в одну монофилетическую группу, поскольку они существенно различаются между собой.

## БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФАГОВЫХ ШАПЕРОНИНОВ

Для изучения структурных и функциональных особенностей фаговых шаперонинов нами были получены и охарактеризованы различными физико-химическими методами рекомбинантные GroEL-подобные белки гигантских бактериофагов: EL *Pseudomonas aeruginosa* [40], ОВР *Pseudomonas fluorescens* [38] и AR9 *Bacillus subtilis* [39]. С помощью аналитического ультрацентрифугирования и электронной микроскопии было установлено, что они имеют разную архитектуру. Подобно большинству известных шаперонинов белок фага EL имеет двухкольцевую морфологию: каждое из его колец состоит из 7 субъединиц gp146 (558 а.о., 61,68 кДа). В отличие от тетрадекамера EL, шаперонины фагов ОВР и AR9 представляют собой однокольцевые гептамеры, состоящие из субъединиц gp246 (520 а.о., 57,75 кДа) и gp228 (562 а.о., 63,75 кДа) соответственно. Однокольцевые шаперонины менее изучены по сравнению с двухкольцевыми. Однако известно, что однокольцевые формы мутантного шаперонина GroEL [41–43] и митохондриального шаперонина

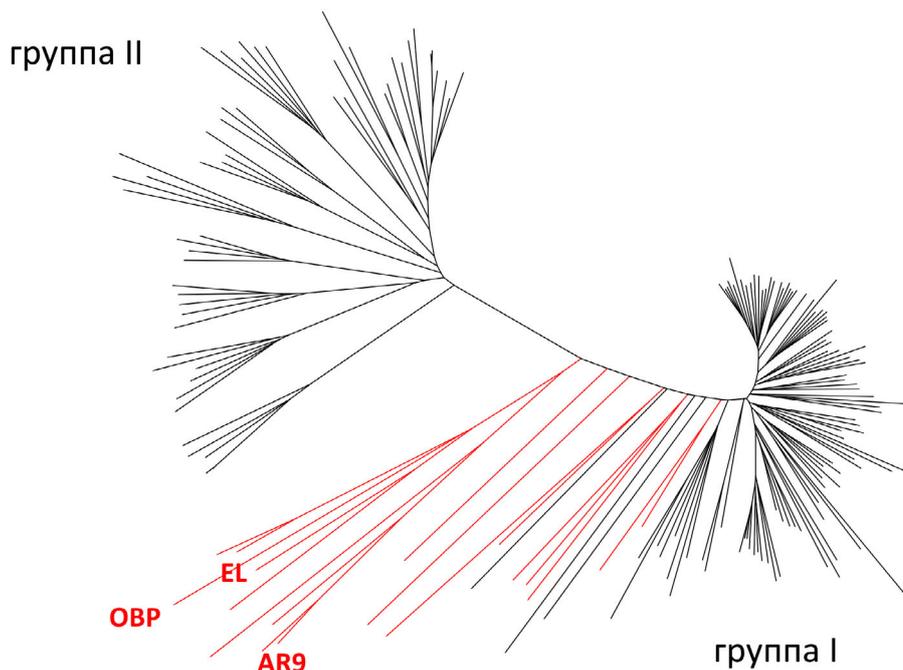


Рис. 2. Расположение фаговых шаперонинов (красный цвет) среди шаперонинов I и II групп (черный цвет) на филогенетическом древе

[44–45] обладают функциональной активностью. Более того, сравнительно недавно было установлено, что в АТРазном цикле бактериальной системы GroEL–GroES происходит временное разделение колец шаперонина [46], а в реакционном цикле митохондриального шаперонина, mHsp60–mHsp10, одновременно функционируют как однокольцевые, так и двухкольцевые формы [47].

С целью изучения функциональной активности фаговых шаперонинов был проведен поиск их потенциальных белков-субстратов среди фаговых белков. С использованием сыворотки на рекомбинантные белки (gp146 и gp246) мы показали, что гены, кодирующие шаперонины, экспрессируются *in vivo* при инфицировании бактериальных клеток *P. aeruginosa* и *P. fluorescens* фагами EL и OBP соответственно [38, 40]. С помощью метода иммунопреципитации из клеток *P. aeruginosa*, инфицированных фагом EL, был выделен gp146, а также его возможные комплексы с белками-субстратами. С помощью масс-спектрометрии был идентифицирован белок-субстрат – фаговый эндолизин (gp188). Эндолизин является ферментом, который участвует в лизисе клетки-хозяина в конце репликационного цикла бактериофага. Разрушая изнутри пептидогликановый слой бактериальной клетки, он обеспечивает выход образовавшихся фаговых частиц наружу.

Ген 188 был клонирован и экспрессирован в клетках *E. coli* [40]. Рекомбинантный gp188 (308 а.о., 34,29 кДа) был использован в опытах *in vitro* для изучения биологической активности фаговых шаперонинов. В качестве белка-субстрата мы также использовали рекомбинантный эндолизин бактериофага OBP – gp279 (342 а.о., 38,17 кДа) [38].

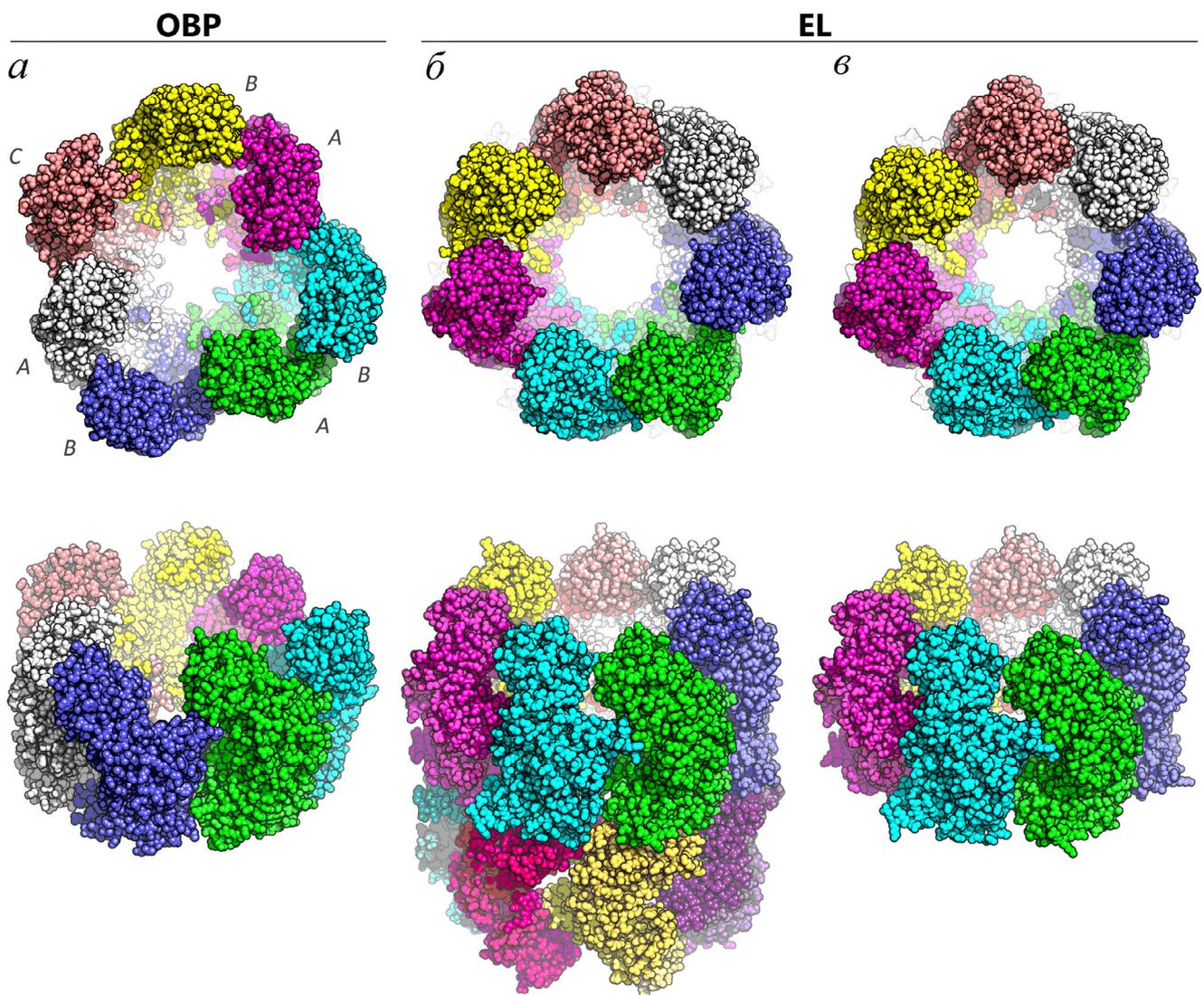
Было показано, что, несмотря на различия в архитектуре, все три фаговых шаперонина обладают шаперонной активностью: в присутствии АТФ они способны сворачивать денатурированные фаговые эндолизины, восстанавливая их ферментативную активность [39]. Для фаговых шаперонинов характерна и шапероноподобная активность: они защищают белки-субстраты от термической агрегации АТФ-зависимым способом [40]. При этом двухкольцевой шаперонин EL, подобно шаперонину GroEL [48], способен предотвращать агрегацию эндолизина и в отсутствие АТФ за счет образования стабильного долгоживущего комплекса с его развернутыми под воздействием температуры полипептидными цепями [40, 49]. Однокольцевые шаперонины функционируют только в присутствии АТФ. Все три фаговых шаперонина обладают слабой АТРазной активностью [39]. Важно отметить, что для функционирования фаговым шаперонинам не требуются кошаперонины. Видимо, по этой причине при масс-спектрометрических

исследованиях среди фаговых и клеточных белков не был обнаружен кандидат на роль кошаперонина.

### СТРУКТУРА ОДНОКОЛЬЦЕВОГО ШАПЕРОНИНА ОВР

На основе изображений, полученных с помощью криоэлектронной микроскопии, определена структура однокольцевого шаперонина ОВР в апо-форме, а также в связанных с АТР $\gamma$ S (медленно гидролизующий аналог АТР) и АDР состояниях с разрешением 4,3 Å, 5,0 Å и 6,0 Å

соответственно [50]. Интересно, что в апо-форме ОВР вращательная симметрия  $C_7$  наблюдается только на уровне экваториальных доменов. В области промежуточного домена симметрия нарушается, а на уровне апикальных доменов наблюдается ярко выраженная асимметрия: гептамер состоит из трех пар субъединиц (обозначенных условно как *A* и *B*) и одной непарной субъединицы (*C*). В каждой паре субъединицы *A* и *B* имеют разную конформацию, а субъединица *C*, которая разрешена в структуре хуже из-за своей подвижности, по-видимому, способна принимать разные конформации между конформациями *A* и *B* (рис. 3, *a*).



**Рис. 3.** Сравнение структур однокольцевого шаперонина ОВР и двухкольцевого шаперонина EL (верхний ряд – вид сверху, нижний – вид сбоку под углом); субъединицы окрашены разными цветами. *a*, *б* – Апо-формы шаперонинов ОВР и EL, полученные с помощью криоэлектронной микроскопии; коды PDB: 6hdd и 6tmv соответственно. Субъединицы ОВР, образующие три пары, обозначены буквами *A* и *B*, а непарная подвижная субъединица – буквой *C*. *в* – Кристаллическая структура шаперонина EL в присутствии АТР–BeF $_3$ ; код PDB: 6tmu

На основе кристаллической структуры GroEL с учетом 17%-ной идентичности аминокислотных последовательностей GroEL и gp246 для субъединиц *A* и *B* были построены атомные модели, которые затем встраивали в карту плотности гептамера. Сравнение полученных моделей со структурой субъединицы шаперонина GroEL в разных конформационных состояниях позволило установить, что субъединица *A* шаперонина ОВР похожа на состояние Т (низкая аффинность к АТР), которое соответствует закрытой конформации GroEL, а субъединица *B* больше похожа на состояние Rsl (АТР-связанное состояние), которое соответствует открытой конформации GroEL. Таким образом, в отличие от GroEL, в апо-форме шаперонина ОВР субъединицы присутствуют одновременно в двух конформациях. В пользу этого могут свидетельствовать экспериментальные данные, полученные нами с помощью метода изотермической титрационной калориметрии. Кривые титрования шаперонина различными нуклеотидами (АТР, АDP, АТР $\gamma$ S) соответствуют модели «два набора сайтов связывания». Это означает, что субъединицы шаперонина имеют два типа нуклеотид-связывающих сайтов, различающихся константами связывания и тепловым эффектом [38, 39].

Известно, что в GroEL переход из состояния Т в состояние Rsl обусловлен функционированием нижнего шарнира, соединяющего промежуточный и экваториальный домены субъединицы (рис. 1) [51]. Такой переход происходит одновременно во всех субъединицах одного кольца (положительная внутрикольцевая кооперативность) [52]. Аминокислотные остатки Pro137 и Gly410, формирующие этот шарнир в GroEL, консервативны в шаперонине ОВР, что обеспечивает вращение апикального и промежуточного доменов относительно экваториального домена для каждой его субъединицы.

Наряду с нижним шарниром в GroEL функционирует еще и верхний шарнир, который соединяет промежуточный домен с апикальным. Согласованное вращение апикальных доменов всех субъединиц приводит к открыванию/закрыванию внутренней полости шаперонина в процессе его АТР-разного цикла. В GroEL верхний шарнир сформирован высококонсервативными остатками Gly192 и Gly375 [53–55]. В шаперонине ОВР соответствующие остатки Gly замещены на большие полярные остатки Glu191 и Asn376, поэтому верхний шарнир в ОВР не функционален. Более того, некоторые солевые мостики, играющие ключевую роль в функционировании GroEL, отсутствуют в шаперонине ОВР. Вместо них появляется новый набор солевых мостиков между промежуточным доменом

субъединицы *A* и апикальным доменом субъединицы *B* внутри каждой пары субъединиц. Между парами такие межсубъединичные взаимодействия отсутствуют, вследствие чего и наблюдается асимметричная картина в верхней части шаперонина ОВР (рис. 3, *a*).

На основе криоэлектронных изображений получены структуры апо-формы другого однокольцевого шаперонина, AR9: без наложения симметрии – с разрешением 4,5 Å и при наложении симметрии  $C_7$  – с разрешением 4,0 Å. В отличие от ОВР, для AR9 характерна менее выраженная асимметрия субъединиц, хотя на уровне апикальных и промежуточных доменов наблюдается структурная гетерогенность [56, 57].

### СТРУКТУРА ДВУХКОЛЬЦЕВОГО ШАПЕРОНИНА EL

Ранние исследования структуры с помощью криоэлектронной микроскопии позволили реконструировать модели шаперонина EL в апо-форме с разрешением 9 Å и в связанных с АТР и АDP состояниях с разрешением 6,8 Å и 11,7 Å соответственно [58]. В отсутствие нуклеотидов и в связанном с АТР состоянии шаперонин имеет двухкольцевую морфологию, при этом расположение его субъединиц на межкольцевом интерфейсе такое же, как у шаперонинов II группы – 1 : 1, а не ступенчатое – 1 : 2, как у GroEL. В апо-форме оба кольца шаперонина EL имеют закрытую конформацию, а в АТР-связанном состоянии оба кольца находятся в открытой конформации, способной связывать белок-субстрат. АDP-связанная форма имеет однокольцевую сфероподобную структуру, что предполагает разделение колец в процессе функционирования шаперонина. Согласно предложенному в 2016 г. гипотетическому механизму АТР-разного цикла шаперонина EL неправильно свернутый белок-субстрат входит во внутреннюю полость каждого из двух связанных с АТР колец и запускает процесс гидролиза АТР, в результате чего происходит перемещение экваториальных доменов в субъединицах, приводящее к разделению колец шаперонина [58].

Объем внутренней полости в каждом однокольцевом комплексе увеличивается почти вдвое, а за счет перестройки апикальных доменов белок-субстрат инкапсулируется во внутренней камере. После диссоциации АDP происходит реассоциация колец с образованием двухкольцевой апо-формы. Связывание АТР вновь открывает внутреннюю полость, позволяя свернутому субстрату выйти наружу, и цикл начинается снова. Таким образом, оба разделившихся

кольца шаперонина EL активны и способны сворачивать белок-субстрат одновременно. При этом между кольцами шаперонина EL отсутствует отрицательный кооперативный эффект, характерный для бактериального шаперонина GroEL, в котором согласно ранее предложенной «bullet»-модели два кольца работают поочередно подобно двухтактному двигателю [59].

Недавние исследования структуры шаперонина EL не подтвердили образования в присутствии ADP сфероподобных однокольцевых комплексов, в которых, как предполагали ранее [58], происходит инкапсулирование белка-субстрата. Напротив, было показано, что дестабилизация межкольцевых взаимодействий в шаперонине EL, приводящая к диссоциации его колец, происходит в присутствии АТФ и только при физиологической концентрации соли (100 мМ KCl); при более низкой концентрации соли (50 мМ KCl) двухкольцевая морфология сохраняется [60].

На основе криоэлектронных изображений получена структура шаперонина EL в разных состояниях [60]. Шаперонин в комплексах с ADP и АТФ $\gamma$ S (разрешение 5,9 Å и 5,8 Å соответственно) имеет двухкольцевую морфологию, причем оба кольца находятся в открытой конформации. Более высокое разрешение (3,45 Å) структуры апо-формы шаперонина EL позволило выявить асимметричную структуру его колец (рис. 3, б) [60].

Структуры двух разных форм однокольцевого шаперонина EL в открытой конформации были также решены кристаллографическими методами. Кристаллическая форма I (разрешение 4,03 Å) имела симметричную структуру, состоящую из однородных субъединиц в АТФ-связанной конформации. Кристаллическая форма II (разрешение 3,54 Å) была асимметрична: субъединицы, имеющие АТФ-связанную конформацию, чередовались с субъединицами в ADP-связанной конформации (рис. 3, в), что похоже на структуру колец апо-формы шаперонина EL (рис. 3, б). Следует отметить, что подобная структура с чередующимися субъединицами ранее была установлена нами для апо-формы однокольцевого шаперонина OBP (рис. 3, а) [50].

Энтацией апикальных доменов имеет низкое сродство к белку-субстрату. Связывание АТФ инициирует разделение колец, при этом однокольцевая форма имеет симметричную топологию апикальных доменов и обладает высокой аффинностью к белку-субстрату. Гидролиз АТФ, скорее всего, происходит в две стадии: сначала АТФ гидролизует в трех чередующихся субъединицах, в результате чего конформация кольца становится похожей на апо-состояние. При этом может быть ослаблено взаимодействие со связанным белком-субстратом, что приводит к его частичному высвобождению. На следующем этапе происходит гидролиз АТФ в оставшихся четырех субъединицах с последующей диссоциацией ADP, что генерирует образование двухкольцевой апо-формы и завершает высвобождение и сворачивание субстрата. На всех этапах шаперонин EL находится в открытой конформации.

Так же, как и в шаперонине EL, связывание нуклеотидов приводит к увеличению конформационной вариабельности субъединиц в однокольцевом шаперонине OBP [50]. В связанном с АТФ $\gamma$ S или ADP состоянии на уровне апикальных доменов асимметрия сохраняется, но, в отличие от апо-формы, статичной остается только одна пара субъединиц A и B, остальные субъединицы становятся динамическими, что может повлиять на связывание и сворачивание белка-субстрата. Невозможность вращения апикальных доменов шаперонина OBP исключает наличие механизма закрывания внутренней полости для инкапсулирования субстрата. Размер внутренней полости при связывании нуклеотида увеличивается незначительно, что указывает на то, что шаперонин OBP во всех состояниях находится в открытой конформации, как и шаперонин EL.

Таким образом, в процессе функционирования вирусные шаперонины претерпевают нуклеотид-зависимые конформационные переходы, защищая белок-субстрат от агрегации без его инкапсулирования. На основании этого можно выдвинуть предположение о том, что фаговые шаперонины представляют собой эволюционно более древние предшественники шаперонинов I и II групп, функционирующих по более сложному механизму.

### АТФ-зависимый ЦИКЛ ВИРУСНЫХ ШАПЕРОНИНОВ

На основании полученных реконструкций предложена гипотетическая модель АТФ-зависимого цикла шаперонина EL [60], согласно которой двухкольцевая апо-форма с асимметричной ори-

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение шаперонинов, кодируемых вирусами бактерий, началось сравнительно недавно, и на сегодняшний день детально охарактеризовано только три шаперонина, кодируемых гигантскими бактериофагами: EL *P. aeruginosa*, OBP

*P. fluorescens* и AR9 *B. subtilis*. Сравнение их по структуре и свойствам с другими известными шаперонинами позволяет предположить, что фаговые шаперонины имеют свои характерные особенности (таблица). Фаговые шаперонины, в отличие от шаперонинов I группы, функционируют без кошаперонинов и не имеют встроенной «крышки», как у шаперонинов II группы. Эта уникальная особенность указывает на то, что их механизм функционирования отличается от механизма функционирования известных шаперонинов I и II групп.

Общепризнано, что главная функция любого шаперонина заключается в том, что он предоставляет белку-субстрату свою внутреннюю полость, куда временно заключаются одна молекула субстрата. Чтобы избежать аберрантных взаимодействий, которые могут привести к агрегации белка-субстрата, сворачивание его протекает изолированно. Поэтому шаперонины I и II групп при функционировании претерпевают АТР-зависимые переходы между открытой и закрытой конформациями. В отличие от них, фаговые шаперонины независимо от состояния (апо-форма или комплексы с нуклеотидами) находятся в открытой конформации. Можно предположить, что на разных стадиях их АТР-зависимого цикла исключается инкапсулирование белка-субстрата, то есть изоляция его от внешней среды. Это характерно как для однокольцевых, так и для двухкольцевых шаперонинов. Разница между ними заключается в том, что в процессе функционирования у двухкольцевых шаперонинов происходит разделение колец.

Как отмечалось выше, бактериальный GroEL способен пассивно защищать белки-субстраты от термической инактивации за счет образования стабильного комплекса с развернутыми молекулами субстрата [48]. В отсутствие кошаперонина GroES инкапсулирования субстрата не происходит, поэтому в этом случае GroEL не восстанавливает биологическую активность денатурированного белка-субстрата [61]. Вопрос о том, каким образом фаговые шаперонины сворачивают денатурированный эндолизин с восстановлением ферментативной активности без его инкапсулирования, пока остается открытым.

Для более полного понимания механизма функционирования необходимо дальнейшее детальное изучение структуры и биохимических свойств как уже охарактеризованных, так и новых представителей шаперонинов, кодируемых вирусами бактерий.

**Финансирование.** Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-04-00605) в рамках Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящий обзор не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hartl, F. U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding, *Nature*, **381**, 571-579, doi: 10.1016/0959-440x(95)80014-r.
- Frydman, J. (2001) Folding of newly translated proteins *in vivo*: the role of molecular chaperones, *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 603-647, doi: 10.1146/annurev.biochem.70.1.603.
- Ellis, R. J. (2006) Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding, *Trends Biochem. Sci.*, **31**, 395-401, doi: 10.1016/j.tibs.2006.05.001.
- Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F. U. (2013) Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis, *Annu. Rev. Biochem.*, **82**, 323-355, doi: 10.1146/annurev-biochem-060208-092442.
- Balchin, D., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F. U. (2020) Recent advances in understanding catalysis of protein folding by molecular chaperones, *FEBS Lett.*, **594**, 2770-2781, doi: 10.1002/1873-3468.13844.
- Horwich, A. L., and Fenton, W. A. (2020) Chaperonin-assisted protein folding: a chronologue, *Q. Rev. Biophys.*, **53**, e4, 1-127, doi: 10.1017/S0033583519000143.
- Vilasi, S., Bulone, D., Caruso Bavisotto, C., Campanella, C., Marino Gammazza, A., et al. (2017) Chaperonin of Group I: oligomeric spectrum and biochemical and biological implications, *Front. Mol. Biosci.*, **4**, 99, doi: 10.3389/fmolb.2017.00099.
- Chiti, F., and Dobson, C. M. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 333-366, doi: 10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901.
- Tittelmeier, J., Nachman, E., and Nussbaum-Krammer, C. (2020) Molecular chaperones: a double-edged sword in neurodegenerative diseases, *Front. Aging Neurosci.*, **12**, 581374, doi: 10.3389/fnagi.2020.581374.
- Hartl, F. U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis, *Nature*, **475**, 324-332, doi: 10.1038/nature10317.
- Hayer-Hartl, M. K., Martin, J., and Hartl, F. U. (1995) Asymmetrical interaction of GroEL and GroES in the ATPase cycle of assisted protein folding, *Science*, **269**, 836-841, doi: 10.1126/science.7638601.
- Cheng, M. Y., Hartl, F. U., Martin, J., Pollock, R. A., Kalousek, F., et al. (1989) Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria, *Nature*, **337**, 620-625, doi: 10.1038/337620a0.
- Dickson, R., Weiss, C., Howard, R. J., Alldrick, S. P., Ellis, R. J., et al. (2000) Reconstitution of higher plant chloro-

- plast chaperonin 60 tetradecamers active in protein folding, *J. Biol. Chem.*, **275**, 11829-11835, doi: 10.1074/jbc.275.16.11829.
14. Ranson, N. A., White, H. E., and Saibil, H. R. (1998) Chaperonins, *Biochem. J.*, **333**, 233-242, doi: 10.1042/bj3330233.
  15. Mande, S. C., Mehra, V., Bloom, B. R., and Hol, W. G. (1996) Structure of the heat shock protein chaperonin-10 of *Mycobacterium leprae*, *Science*, **271**, 203-207, doi: 10.1126/science.271.5246.203.
  16. Koumoto, Y., Shimada, T., Kondo, M., Hara-Nishimura, I., and Nishimura, M. (2001) Chloroplasts have a novel Cpn10 in addition to Cpn20 as co-chaperonins in *Arabidopsis thaliana*, *J. Biol. Chem.*, **276**, 29688-29694, doi: 10.1074/jbc.M102330200.
  17. Sharkia, R., Bonshtien, A. L., Mizrahi, I., Weiss, C., Niv, A., et al. (2003) On the oligomeric state of chloroplast chaperonin 10 and chaperonin 20, *Biochim. Biophys. Acta*, **1651**, 76-84, doi: 10.1016/S1570-9639(03)00237-1.
  18. Zhang, J., Ma, B., DiMaio, F., Douglas, N. R., Joachimiak, L. A., et al. (2011) Cryo-EM structure of a group II chaperonin in the prehydrolysis ATP-bound state leading to lid closure, *Structure*, **19**, 633-639, doi: 10.1016/j.str.2011.03.005.
  19. Zang, Y., Jin, M., Wang, H., Cui, Z., Kong, L., et al. (2016) Staggered ATP binding mechanism of eukaryotic chaperonin TRiC (CCT) revealed through high-resolution cryo-EM, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **23**, 1083-1091, doi: 10.1038/nsmb.3309.
  20. Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., et al. (1994) The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å, *Nature*, **371**, 578-586, doi: 10.1038/371578a0.
  21. Skjærven, L., Cuellar, J., Martinez, A., and Valpuesta, J. M. (2015) Dynamics, flexibility, and allostery in molecular chaperonins, *FEBS Lett.*, **589**, 2522-2532, doi: 10.1016/j.febslet.2015.06.019.
  22. Georgopoulos, C. P., Hendrix, R. W., Kaiser, A. D., and Wood, W. B. (1972) Role of the host cell in bacteriophage morphogenesis: effects of a bacterial mutation on T4 head assembly, *Nat. New Biol.*, **239**, 38-41, doi: 10.1038/newbio239038a0.
  23. Georgopoulos, C. P., and Hohn, B. (1978) Identification of a host protein necessary for bacteriophage morphogenesis (the *groE* gene product), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 131-135, doi: 10.1073/pnas.75.1.131.
  24. Takano, T., and Kakefuda, T. (1972) Involvement of a bacterial factor in morphogenesis of bacteriophage capsid, *Nat. New Biol.*, **239**, 34-37, doi: 10.1038/newbio239034a0.
  25. Coppo, A., Manzi, A., Pulitzer, J. F., and Takahashi, H. (1973) Abortive bacteriophage T4 head assembly in mutants of *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **76**, 61-87, doi: 10.1016/0022-2836(73)90081-8.
  26. Georgopoulos, C. P., Hendrix, R. W., Casjens, S. R., and Kaiser, A. D. (1973) Host participation in bacteriophage lambda head assembly, *J. Mol. Biol.*, **76**, 45-60, doi: 10.1016/0022-2836(73)90080-6.
  27. Zweig, M., and Cummings, D. J. (1973) Cleavage of head and tail proteins during bacteriophage T5 assembly: selective host involvement in the cleavage of a tail protein, *J. Mol. Biol.*, **80**, 505-518, doi: 10.1016/0022-2836(73)90418-x.
  28. Hänninen, A. L., Bamford, D. H., and Bamford, J. K. (1997) Assembly of membrane-containing bacteriophage PRD1 is dependent on GroEL and GroES, *Virology*, **227**, 207-210, doi: 10.1006/viro.1996.8308.
  29. Grimaud, R., and Toussaint, A. (1998) Assembly of both the head and tail of bacteriophage Mu is blocked in *Escherichia coli groEL* and *groES* mutants, *J. Bacteriol.*, **180**, 1148-1153, doi: 10.1128/JB.180.5.1148-1153.1998.
  30. Van der Vies, S. M., Gatenby, A. A., and Georgopoulos, C. (1994) Bacteriophage T4 encodes a co-chaperonin that can substitute for *Escherichia coli* GroES in protein folding, *Nature*, **368**, 654-656, doi: 10.1038/368654a0.
  31. Ang, D., Richardson, A., Mayer, M. P., Keppel, F., Krisch, H., et al. (2001) Pseudo-T-even bacteriophage RB49 encodes CocO, a cochaperonin for GroEL, which can substitute for *Escherichia coli's* GroES and bacteriophage T4's Gp31, *J. Biol. Chem.*, **276**, 8720-8726, doi: 10.1074/jbc.M008477200.
  32. Hertveldt, K., Lavigne, R., Pleteneva, E., Sernova, N., Kurochkina, L., et al. (2005) Genome comparison of *Pseudomonas aeruginosa* large phages, *J. Mol. Biol.*, **354**, 536-545, doi: 10.1016/j.jmb.2005.08.075.
  33. Kiljunen, S., Hakala, K., Pinta, E., Huttunen, S., Pluta, P., et al. (2005) Yersiniophage phiR1-37 is a tailed bacteriophage having a 270 kb DNA genome with thymidine replaced by deoxyuridine, *Microbiology*, **151**, 4093-4102, doi: 10.1099/mic.0.28265-0.
  34. Cornelissen, A., Hardies, S. C., Shaburova, O. V., Krylov, V. N., Mattheus, W., et al. (2012) Complete genome sequence of the giant virus OBP and comparative genome analysis of the diverse φKZ-related phages, *J. Virol.*, **86**, 1844-1852, doi: 10.1128/JVI.06330-11.
  35. Jang, H. B., Fagutao, F. F., Nho, S. W., Park, S. B., Cha, I. S., et al. (2013) Phylogenomic network and comparative genomics reveal a diverged member of the φKZ-related group, marine vibrio phage φJM-2012, *J. Virol.*, **87**, 12866-12878, doi: 10.1128/JVI.02656-13.
  36. Lavysch, D., Sokolova, M., Minakhin, L., Yakunina, M., Artamonova, T., et al. (2016) The genome of AR9, a giant transducing Bacillus phage encoding two multisubunit RNA polymerases, *Virology*, **495**, 185-196, doi: 10.1016/j.virol.2016.04.030.
  37. Marine, R. L., Nasko, D. J., Wray, J., Polson, S. W., and Wommack, K. E. (2017) Novel chaperonins are prevalent in the viroplankton and demonstrate links to viral biology and ecology, *ISME J.*, **11**, 2479-2491, doi: 10.1038/ismej.2017.102.
  38. Semenyuk, P. I., Orlov, V. N., Sokolova, O. S., and Kurochkina, L. P. (2016) New GroEL-like chaperonin of bacteriophage OBP *Pseudomonas fluorescens* suppresses thermal protein aggregation in an ATP-dependent manner, *Biochem. J.*, **473**, 2383-2393, doi: 10.1042/BCJ20160367.
  39. Semenyuk, P. I., Moiseenko, A. V., Sokolova, O. S., Muronetz, V. I., and Kurochkina, L. P. (2020) Structural and functional diversity of novel and known bacteriophage-encoded chaperonins, *Int. J. Biol. Macromol.*, **157**, 544-552, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.189.
  40. Kurochkina, L. P., Semenyuk, P. I., Orlov, V. N., Robben, J., Sykilinda, N. N., et al. (2012) Expression and functional characterization of the first bacteriophage-encoded chaperonin, *J. Virol.*, **86**, 10103-10111, doi: 10.1128/JVI.00940-12.
  41. Sun, Z., Scott, D. J., and Lund, P. A. (2003) Isolation and characterisation of mutants of GroEL that are fully functional as single rings, *J. Mol. Biol.*, **332**, 715-728, doi: 10.1016/S0022-2836(03)00830-1.
  42. Illingworth, M., Ramsey, A., Zheng, Z., and Chen, L. (2011) Stimulating the substrate folding activity of a single ring GroEL variant by modulating the cochaperonin GroES, *J. Biol. Chem.*, **286**, 30401-30408, doi: 10.1074/jbc.M111.255935.
  43. Illingworth, M., Salisbury, J., Li, W., Lin, D., and Chen, L. (2015) Effective ATPase activity and moderate chaperonin-cochaperonin interaction are important for the functional single-ring chaperonin system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **466**, 15-20, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.08.034.

44. Viitanen, P. V., Lorimer, G. H., Seetharam, R., Gupta, R. S., Oppenheim, J., et al. (1992) Mammalian mitochondrial chaperonin 60 functions as a single toroidal ring, *J. Biol. Chem.*, **267**, 695-698.
45. Nielsen, K. L., and Cowan, N. J. (1998) A single ring is sufficient for productive chaperonin-mediated folding *in vivo*, *Mol. Cell*, **2**, 93-99, doi: 10.1016/S1097-2765(00)80117-3.
46. Yan, X., Shi, Q., Bracher, A., Miličić, G., Singh, A. K., et al. (2018) GroEL ring separation and exchange in the chaperonin reaction, *Cell*, **172**, 605-617.e11, doi: 10.1016/j.cell.2017.12.010.
47. Gomez-Llorente, Y., Jebara, F., Patra, M., Malik, R., Nisemlat, S., et al. (2020) Structural basis for active single and double ring complexes in human mitochondrial Hsp60-Hsp10 chaperonin, *Nat. Commun.*, **11**, 1916, doi: 10.1038/s41467-020-15698-8.
48. Buchner, J., Schmidt, M., Fuchs, M., Jaenicke, R., Rudolph, R., et al. (1991) GroE facilitates refolding of citrate synthase by suppressing aggregation, *Biochemistry*, **30**, 1586-1591.
49. Semenyuk, P. I., Orlov, V. N., and Kurochkina, L. P. (2015) Effect of chaperonin encoded by gene 146 on thermal aggregation of lytic proteins of bacteriophage EL *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 172-179, doi: 10.1134/S0006297915020042.
50. Stanishneva-Konovalova, T. B., Semenyuk, P. I., Kurochkina, L. P., Pichkur, E. B., Vasilyev, A. L., et al. (2020) Cryo-EM reveals an asymmetry in a novel single-ring viral chaperonin, *J. Struct. Biol.*, **209**, 107439, doi: 10.1016/j.jsb.2019.107439.
51. Clare, D. K., Vasishtan, D., Stagg, S., Quispe, J., Farr, G. W., et al. (2012) ATP-triggered conformational changes delineate substrate-binding and -folding mechanics of the GroEL chaperonin, *Cell*, **149**, 113-123, doi: 10.1016/j.cell.2012.02.047.
52. Horwich, A. L. (2011) Protein folding in the cell: An inside story, *Nat. Med.*, **17**, 1211-1216, doi: 10.1038/nm.2468.
53. Xu, Z., Horwich, A. L., and Sigler, P. B. (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)<sub>7</sub> chaperonin complex, *Nature*, **388**, 741-750, doi: 10.1038/41944.
54. Brocchieri, L., and Karlin, S. (2000) Conservation among HSP60 sequences in relation to structure, function, and evolution, *Protein Sci.*, **9**, 476-486, doi: 10.1110/ps.9.3.476.
55. Fei, X., Yang, D., LaRonde-LeBlanc, N., and Lorimer, G. H. (2013) Crystal structure of a GroEL-ADP complex in the relaxed allosteric state at 2.7 Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, E2958-E2966, doi: 10.1073/pnas.1311996110.
56. Sokolova, O., Pichkur, E., and Kurochkina, L. (2020) Cryo-EM structure of the novel viral chaperonin, encoded by gene 228 of bacteriophage AR9 *Bacillus subtilis*, *Microsc. Microanal.*, **26**, 1286-1287, doi: 10.1017/S1431927620017584.
57. Maslova, E., Pichkur, E., Semenyuk, P., Kurochkina, L., and Sokolova, O. (2021) Abstract P-45: Structure of the bacteriophage AR9 *Bacillus subtilis* chaperonin according to cryo-electron microscopy, *Int. J. Biomed.*, **11**, S32, doi: 10.21103/IJBM.11.Suppl\_1.P45.
58. Molugu, S. K., Hildenbrand, Z. L., Morgan, D. G., Sherman, M. B., He, L., et al. (2016) Ring separation highlights the protein-folding mechanism used by the phage EL-encoded chaperonin, *Structure*, **24**, 537-546, doi: 10.1016/j.str.2016.02.006.
59. Xu, Z., and Sigler, P. B. (1998) GroEL/GroES: structure and function of a two-stroke folding machine, *J. Str. Biol.*, **124**, 129-141, doi: 10.1006/jsbi.1998.4060.
60. Bracher, A., Paul, S. S., Wang, H., Wischniewski, N., Hartl, F. U., et al. (2020) Structure and conformational cycle of a bacteriophage-encoded chaperonin, *PLoS One*, **15**, e0230090, doi: 10.1371/journal.pone.0230090.
61. Horwich, A. L., Apetri, A. C., and Fenton, W. A. (2009) The GroEL/GroES cis cavity as a passive anti-aggregation device, *FEBS Lett.*, **583**, 2654-2662, doi: 10.1016/j.febslet.2009.06.049.

## STRUCTURAL AND FUNCTIONAL FEATURES OF VIRAL CHAPERONINS

### Review

L. P. Kurochkina<sup>1\*</sup>, P. I. Semenyuk<sup>1</sup>, and O. S. Sokolova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: lpk56@mail.ru

<sup>2</sup> Department of Bioengineering, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Chaperonins provide a proper folding of proteins *in vivo* and *in vitro* and, as was thought until recently, are characteristic of prokaryotes, eukaryotes, and archaea. However, it turned out that some bacteria viruses (bacteriophages) encode their own chaperonins. This review presents the results of investigations of the first representatives of this new group chaperonins: the double-ring EL chaperonin and the single-ring OBP and AR9 chaperonins. A comparative analysis of the biochemical properties and structure of phage chaperonins with each other and with other known group I and group II chaperonins was carried out.

**Keywords:** chaperonin, bacteriophage, spatial structure, cryoelectron microscopy, crystallography