

## МАЛЫЕ БЕЛКИ ТЕПЛОВОГО ШОКА И АКТИНОВЫЕ ФИЛАМЕНТЫ

### Обзор

© 2022 Л.К. Муранова, В.М. Шатов, Н.Б. Гусев\*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,  
119991 Москва, Россия; электронная почта: NBGusev@mail.ru

Поступила в редакцию 14.03.2022

После доработки 28.04.2022

Принята к публикации 28.04.2022

Малые белки теплового шока (small heat shock proteins, sHsp) играют важную роль в поддержании стабильного состояния протеома, в частности цитоскелета и сократительного аппарата клеток. Различные стрессорные воздействия зачастую сопровождаются перемещением sHsp на актиновые филаменты, и поэтому в литературе бытует мнение, что малые белки теплового шока являются актин-связывающими белками. Исследования последних лет показали неполноту и неточность этого предположения. Вызванное стрессом перемещение sHsp на актиновый филамент, скорее всего, не является следствием прямого взаимодействия этих белков с интактным актином, а обусловлено шапероноподобной активностью и взаимодействием sHsp с различными актин-связывающими белками. HspB1 и HspB5 взаимодействуют с гигантскими эластичными белками титином и филамином и тем самым обеспечивают целостность сократительного аппарата и его правильную локализацию в клетке. HspB6 взаимодействует с универсальным адаптерным белком 14-3-3 и таким образом лишь опосредованно может влиять на структуру актиновых филаментов. HspB7 взаимодействует с филамином С и контролирует сборку актиновых филаментов. HspB8 образует прочный комплекс с универсальным адаптерным белком Bag3 и участвует в процессе шаперон-зависимой избирательной аутофагии (CASA) различных актин-связывающих белков (в частности, филаминов), а также в зависимых от актина процессах, происходящих при митозе. Таким образом, механизмы участия sHsp в поддержании нормального функционирования сократительного аппарата и цитоскелета намного сложнее и разнообразнее, чем это виделось ранее. Представленный анализ данных литературы указывает на необходимость пересмотра старых гипотез о прямом взаимодействии малых белков теплового шока с интактным актином и требует более подробного исследования влияния sHsp на многочисленные белки, участвующие в формировании и ремоделировании актинового филамента.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** малые белки теплового шока, актин, белок-белковые взаимодействия, шапероноподобная активность, фосфорилирование.

**DOI:** 10.31857/S0320972522080127, **EDN:** AZHJIW

### ВВЕДЕНИЕ

Малые белки теплового шока (small heat shock proteins, sHsp) образуют большое семейство белков, объединённых наличием в своем составе консервативного  $\alpha$ -кристаллинового домена ( $\alpha$ -crystallin domain, ACD) (80–100 а.о.) и относительно небольшой молекулярной массой мономеров, колеблющейся в интервале от 12 до 43 кДа [1, 2]. Эти белки обнаружены во всех царствах живых существ (вирусы, археи, бактерии, растения, животные) [3, 4]. В геноме человека обнаружено 10 генов, кодирующих малые белки теплового шока, часть из кото-

рых (HspB1, HspB5, HspB6, HspB8) экспрессируется повсеместно, а другие (HspB2, HspB3, HspB4, HspB7, HspB9, HspB10) представлены преимущественно в определенных органах и тканях [5–7]. Эти белки играют важную роль в поддержании протеостаза, связывают частично денатурированные или неправильно свернутые белки, предотвращая их агрегацию и перенося их на АТФ-зависимые шапероны или способствуя их протеолитической деградации [4, 8], могут участвовать в поддержании нормального редокс-состояния клеток [9], вовлечены в регуляцию процессов апоптоза [10], а также участвуют в регуляции и защите сократительного аппарата и цитоскелета клеток [11, 12]. В литературе достаточно много про-

\* Адресат для корреспонденции.

тиворечивых данных о влиянии малых белков теплового шока на промежуточные филаменты, микротрубочки и микрофиламенты, образованные актином [11, 12]. В этом миниобзоре мы ограничимся рассмотрением влияния различных малых белков теплового шока только на актиновые микрофиламенты.

### **ВЛИЯНИЕ МАЛОГО БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА HspB1 (Hsp27) НА ФОРМИРОВАНИЕ, СТРУКТУРУ И СВОЙСТВА АКТИНОВЫХ ФИЛАМЕНТОВ**

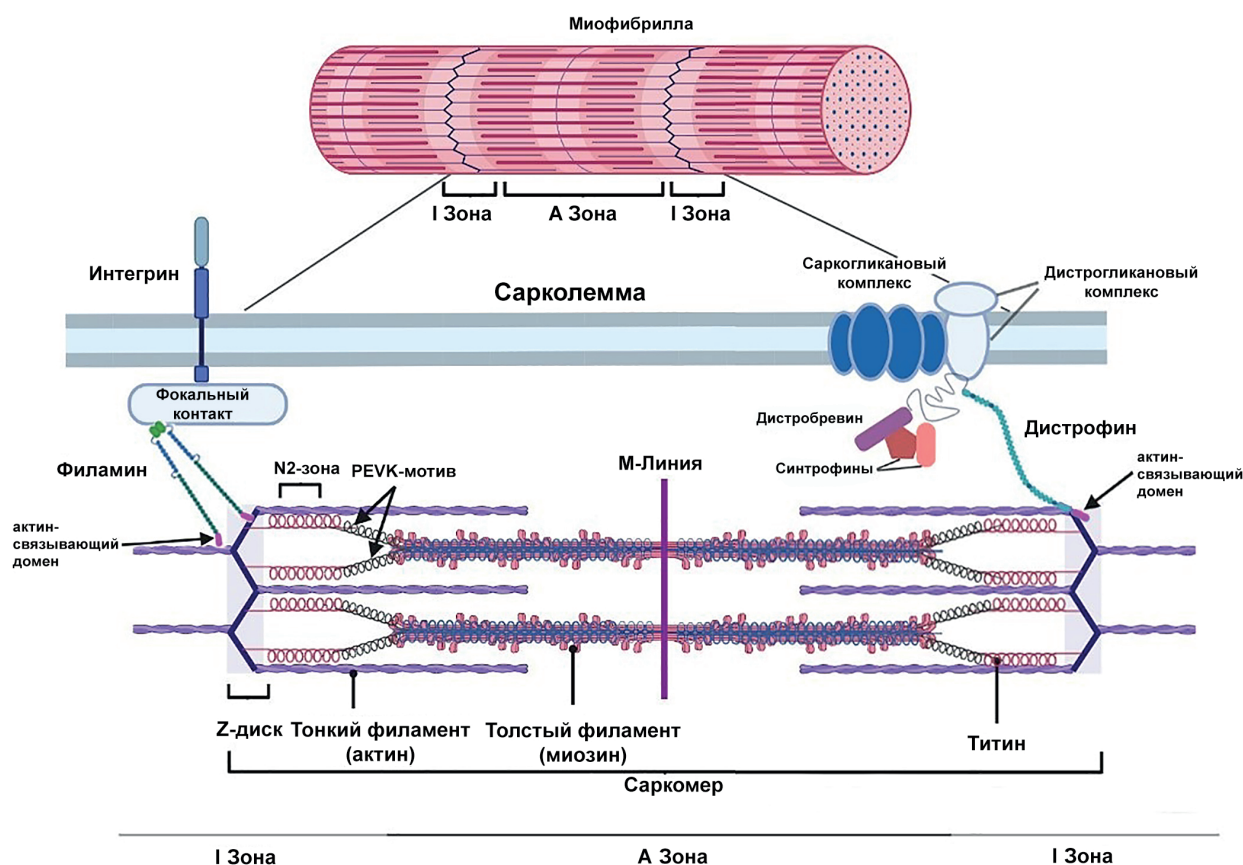
В конце 80-х и начале 90-х годов прошлого века было установлено, что белок с молекулярной массой 25 кДа, выделяемый из мускульного желудка индюка, способен ингибировать процесс полимеризации актина [13, 14]. Позднее было установлено, что этот белок гомологичен малому белку теплового шока HspB1 (Hsp27) и похож по своей структуре на  $\alpha$ B-кристаллин [14] (таблица). Немного позднее было установлено, что схожий белок с кажущейся молекулярной массой 25 кДа, выделяемый из асцитной опухоли Эрлиха мышей, также способен ингибировать полимеризацию актина [15]. При этом было показано, что ингибирующей активностью обладают только нефосфорилированные мономеры этого белка, а фосфорилированные мономеры или олигомеры не обладают ингибирующей активностью. Этот факт вызывал определенное недоумение, потому что фосфорилирование обычно сопровождается диссоциацией крупных олигомеров HspB1 [16], и в этой связи представляется довольно затруднительным получить как нефосфорилированные мономеры, так и фосфорилированные олигомеры HspB1. Кроме того, оказалось, что ингибирующей активностью обладает только белок, выделенный из опухоли, в то время как рекомбинантный белок лишен этой активности [16]. Тем не менее исследования в этом направлении продолжались, и была предпринята попытка выделить пептиды Hsp25, способные ингибировать полимеризацию актина [17]. Было установлено, что пептиды, ограниченные остатками 43–57 и 92–106 Hsp25, способны затруднять полимеризацию актина, и при этом их ингибирующая активность сопоставима или даже выше активности соответствующих ингибиторных пептидов кофилина или филамина [17]. Однако даже в этом случае существенное ингибирование полимеризации актина наблюдалось только при добавлении эквимольных концентраций интактного Hsp25 и/или при 4-кратном избытке пептидов этого белка [16, 17].

Пытаясь воспроизвести эти результаты, мы получили рекомбинантный препарат Hsp25 курицы, а также фосфоимитирующие мутантные формы этого белка, в которых три фосфорилируемых остатка серина были заменены на остатки аспарагиновой кислоты [18]. В наших руках Hsp25 практически не влиял на скорость полимеризации актина, но эффективно препятствовал агрегации частично денатурированного актина. При этом наибольшей шаперонной активностью обладала мутантная форма, в которой все три остатка серина (Ser15, Ser77, Ser81), подвергающиеся фосфорилированию, были заменены на остатки аспарагиновой кислоты [18]. Аналогичные результаты были получены при исследовании как рекомбинантного Hsp25 курицы, так и рекомбинантного гомолога Hsp27 (HspB1) человека [19, 20]. Оказалось, что нагревание фибриллярного актина сопровождается диссоциацией частично денатурированного мономерного актина. HspB1 (и особенно его псевдофосфорилированная мутантная форма) связывает этот частично денатурированный актин и препятствует агрегации, индуцированной повышением температуры. Большинство экспериментов, в которых исследовалось влияние HspB1 на полимеризацию актина, проводили с использованием актина, меченого пиренилмалеимидом. Эта модификация осуществляется в довольно жестких условиях, в ходе которых достаточно трудно избежать частичной денатурации актина. Можно предположить, что описанный ранее эффект Hsp25 из мускульного желудка индюка и его гомолога HspB1 человека на полимеризацию актина был отчасти обусловлен связыванием малого белка теплового шока с частично денатурированным актином.

Параллельно с экспериментами по влиянию HspB1 на полимеризацию актина были проведены подробные опыты по внутриклеточной локализации HspB1 в скелетных мышцах и в сердце млекопитающих. Было установлено, что в состоянии покоя HspB1 (как и некоторые другие малые белки теплового шока, такие как HspB2, HspB5, HspB6, HspB7) преимущественно локализованы диффузно в цитозоле, а после различного рода стрессов (ишемия/реперфузия, повышение температуры и др.) эти белки перемещаются на сократительный аппарат [21]. Более того, в клетках яичников китайского хомячка (СНО) гиперэкспрессия HspB1 приводила к заметной стабилизации нитей актина и увеличивала устойчивость актинового цитоскелета к действию цитохалазина D [22, 23]. В этих экспериментах указанный эффект наблюдался только в случае фосфорилированного HspB1 и отсутствовал в случае нефосфорилированно-

го белка. Перемещение HspV1 из цитозоля на актиновый филамент и повышение стабильности актиновых филаментов наблюдалось как в случае различных скелетных мышц, так и в случае кардиомиоцитов [24]. Таким образом, возникло своеобразное противоречие. С одной стороны, исследования, выполненные на изолированных белках, свидетельствовали о том, что HspV1 якобы ингибирует процесс полимеризации актина, а с другой стороны, эксперименты, выполненные на изолированных клетках и мышцах, свидетельствовали о том, что HspV1 стабилизирует актиновые филаменты и препятствует их повреждению в ходе различных стрессовых воздействий. Для того чтобы каким-то образом обойти это противоречие, было высказано предположение о том, что нефосфорилированные мономеры кэпируют плюс-конец и ингибируют полимеризацию актина, а фосфорилированные мономеры (и, возможно, небольшие олигомеры) каким-то образом стабилизируют актиновые филаменты

[11, 12]. Однако, как нам кажется, даже такое объяснение не было достаточно убедительным, так как концентрация нефосфорилированных форм Hsp27 *a priori* должна быть крайне низкой (потому что именно фосфорилирование вызывает диссоциацию крупных олигомеров), а все описанные ранее эффекты наблюдались при концентрациях Hsp27, сопоставимых с концентрацией актина. Скорее всего, этот факт косвенно свидетельствовал о том, что влияние Hsp27 на актиновый филамент было опосредованным и обусловлено взаимодействием малого белка теплового шока не с актином, а с какими-то минорными белками, связанными с актиновым филаментом. Сократительный аппарат скелетных и сердечных мышц построен достаточно сложно и, помимо актина и миозина, содержит большое количество вспомогательных и регуляторных белков (рис. 1). Косвенным подтверждением того, что HspV1 связывается не с актином, а с другими белками явилось то, что обработка сократительно-



**Рис. 1.** Схема строения сократительного аппарата мышцы. Саркомер состоит из тонких (актиновых) филаментов, связанных с Z-диском, и толстых (миозиновых) филаментов с центром в M-линии. Титин выполняет важную роль в поддержании целостности саркомера, контактируя как с тонкими, так и с толстыми филаментами. В первичной структуре титина выделяют N2-зону и PEVK-мотивы, необходимые для функционирования этого белка. Связь миофибриллы с сарколеммой осуществляется благодаря белку дистрофину, чей актин-связывающий домен взаимодействует с саркомером. Дистробревин, саркогликаны, дистрогликаны, а также вспомогательные белки синтрофины также играют роль в этом процессе (правая сторона рисунка). Кроме того, саркомер может взаимодействовать с интегриновыми комплексами на поверхности мембраны за счет белка филамина и таким образом осуществлять связь миофибриллы с сарколеммой (левая сторона рисунка)

## Малые белки теплового шока, их тканевое распределение и белки-партнеры, участвующие в формировании и ремоделировании актиновых филаментов

Принятые обозначения и ранее использованные обозначения	Молекулярная масса мономера, Да	Тканевое распределение	Белки-партнеры и/или процессы, влияющие на актиновые филаменты	Ссылки
HspB1 (Hsp25, Hsp27, Hsp28)	22 783	повсеместно	титин тропонин I тропонин T филамин C	[25, 26] [27, 28] [27, 28] [29]
HspB2 (MDPK)	20 233	нейроны, скелетные и сердечные мышцы	миогенез, энергетический протеостаз	[34] [35–38]
HspB3	16 966	нейроны, скелетные и сердечные мышцы	миогенез	[34]
HspB4 ( $\alpha$ A-кристаллин)	19 909	хрусталик глаза	не описано	нет
HspB5 ( $\alpha$ B-кристаллин)	20 159	повсеместно	титин	[25, 43, 44]
HspB6 (Hsp20)	17 136	повсеместно	$\alpha$ -актинин 14-3-3 Bag3	[54, 55] [62, 63] [82, 83]
HspB7 (cvHsp)	18 611	сердечные и скелетные мышцы, адипоциты	филамин C титин	[69] [74]
HspB8 (Hsp22, H11)	21 604	повсеместно	Bag3	[79–81]
HspB9	17 486	семенники	не описаны	нет
HspB10 (ODF)	28 366	семенники	не описаны	нет

го аппарата 1M NaSCN (тиоцианат натрия), приводящая к полной экстракции актина, не сопровождалась экстрагированием малых белков теплового шока HspB1, HspB5 и HspB7 [21]. Этот факт свидетельствовал о том, что HspB1 связывается не непосредственно с актином, а с какими-то актин-связывающими белками или с белками, расположенными в непосредственной близости от нитей актина. Дальнейшие исследования показали, что HspB1 действительно связывается с областью N2B титина (рис. 1, таблица), которая располагается в удаленной от Z-диска части актинового филамента. При этом связывание HspB1 усиливается при растяжении, и это взаимодействие обеспечивается за счет контактов иммуноглобулиновых доменов титина с иммуноглобулиновым доменом кристаллинового домена HspB1 [25]. Такое взаимодействие, происходящее в миоцитах, предот-

вращает агрегацию молекул титина и уменьшает жесткость мышц, возрастающую при агрегации титина [25]. Растяжение и повышенная температура приводят к перемещению HspB1 и на участки титина, расположенные вблизи актиновых филаментов кардиомиоцитов *Danio rerio* [26]. Авторы подчеркивают, что HspB1 не связывается ни с десмином, ни с  $\alpha$ -актинином, ни с фибриллярным актином – и единственным партнером белка теплового шока после стрессовых воздействий является титин.

В определенной степени продолжением этих работ стало исследование внутриклеточного распределения HspB1 в кардиомиоцитах крыс после оверэкспрессии этого белка, индуцированной введением аденовируса, содержащего ген *HspB1*. Было установлено, что HspB1 связывается с тропонином I и тропонином T, регуляторными белками, расположенными на

актиновом филаменте. При этом участки связывания HspB1 располагаются в N-концевой части тропонина T и в C-концевой части тропонина I [27]. Вызванное ишемией/реперфузией перемещение HspB1 из цитозоля на сократительный аппарат приводит к стабилизации компонентов тропонинового комплекса, что, вероятно, может быть обусловлено тем, что малый белок теплового шока защищает компоненты тропонина от протеолиза под действием Ca-зависимой протеазы, кальпаина [28].

Наконец, в последнее время появились данные о том, что HspB1 способен взаимодействовать с C-концевыми повторами d18–d21 филамина C [29]. Димерный актин-связывающий белок филамин располагается вблизи Z-диска и обеспечивает связывание нитей актина и взаимодействие с белками промежуточных филаментов (рис. 1, таблица). Иммуноглобулиновые домены, расположенные в C-концевой части, обеспечивают димеризацию филамина, и высказывается предположение, что связывание HspB1 может препятствовать избыточному растяжению молекулы филамина C [29]. К сожалению, это в высшей степени интересное исследование, проведенное с использованием широкого набора самых современных методов, было выполнено на сравнительно коротких фрагментах обоих белков, и поэтому остается не вполне понятным, реализуются ли такие взаимодействия в случае полноразмерных белков.

Завершая этот раздел, можно заключить, что после различного рода стрессов HspB1 перемещается из цитозоля на актиновый филамент, где он взаимодействует не непосредственно с интактным актином, а с минорными белками, связанными с актином или расположенными в непосредственной близости от нитей актина (титином, филамином C, компонентами тропонина). Такого рода взаимодействие защищает эти белки от избыточного растяжения или протеолитической деградации и тем самым обеспечивает защиту сократительного аппарата от неблагоприятных воздействий.

### **HspB2 и HspB3, ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ СЕМЕЙСТВА МАЛЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА**

HspB2 и HspB3 экспрессируются в мышцах, сенсорных и моторных нейронах и склонны образовывать гетероолигомерные комплексы со стехиометрией HspB2/HspB3, равной 3/1 (таблица) [30]. HspB2 способен активировать Ser/Thr-протеинкиназу (так называемую

Myotonic Dystrophy Protein Kinase, MDPK), недостаточная активность которой ведет к миотонической дистрофии [31]. HspB2 может локализоваться в различных клеточных компартментах, таких как цитозоль, ядро, сократительный аппарат и митохондрии. HspB2 может образовывать так называемые безмембранные жидкие капли, которые могут располагаться как в цитозоле, так и в ядре. Такие капли, локализованные в ядре, могут взаимодействовать с ламинем A/C и таким образом влиять на взаимодействие ДНК с ядерной мембраной, что регулирует экспрессию определенных генов [32]. HspB3 взаимодействует с HspB2 и влияет на его способность образовывать безмембранные капли и таким образом влияет на функционирование генов. В свою очередь, HspB3 участвует в замене рецептора ламина B на рецептор ламина A/C, что приводит к специфической активации генов, обеспечивающих дифференцировку миобластов [33]. Таким образом, эти два взаимодействующих между собой белка играют важную роль в ходе миогенеза и экспрессируются в строго определенные промежутки времени развития мышцы [34]. В опытах, выполненных на линии мышей с двойным нокаутом генов  $\alpha$ B-кристаллина (HspB5) и HspB2, было установлено, что в нормальных условиях двойной нокаут не приводит к существенному изменению морфологии и свойств сердечной мышцы. Однако после ишемии/реперфузии сердца мутантных мышей содержали больше некротических участков и восстанавливали сократительную активность медленнее, чем сердца мышей дикого типа [35]. В том случае, если путем скрещивания удавалось получить линию мышей с нокаутом гена HspB2 и оверэкспрессией HspB5, то после ишемии/реперфузии происходило медленное восстановление уровня АТФ и фосфокреатина, но при этом происходило практически полное восстановление сократительной активности [36]. На основе этих результатов был сделан вывод о том, что HspB2 участвует в поддержании энергетического гомеостаза, а HspB5 защищает и стабилизирует сократительный аппарат. Как и в случае других малых белков теплового шока, ишемия/реперфузия сопровождается перемещением HspB2 на сократительный аппарат [37, 38]. Ингибирование протеасомной системы также сопровождается транслокацией HspB2 и HspB3 на сократительный аппарат [39]. Скорее всего, такие перемещения нельзя считать специфическими, и HspB2, как и HspB3 напрямую не участвуют в регуляции сократительной активности и лишь неспецифически связываются с сократительным аппаратом.

## **α-КРИСТАЛЛИНЫ И АКТИНОВЫЕ МИКРОФИЛАМЕНТЫ**

αА-кристаллин (HspB4) и αВ-кристаллин (HspB5) получили свое название вследствие того, что являются одними из основных белков хрусталика глаза и обеспечивают его прозрачность, предотвращая агрегацию других белков хрусталика (таблица). HspB4 экспрессируется только в хрусталике глаза, в то время как HspB5 экспрессируется практически повсеместно [5–7]. В ранних работах было показано, что нефракционированный α-кристаллин глаза, так же как αА- и αВ-кристаллины, способен ингибировать агрегацию фибриллярного актина, индуцированную нагреванием. Помимо этого, оказалось, что кристаллины способны предотвращать деполимеризацию фибриллярного актина, вызванную цитохалазином D [40]. При этом было высказано предположение, что защитное действие кристаллина связано с тем, что первичная структура пептида актина, ограниченного остатками 63–70 (GILTLKYP), похожа на первичную структуру пептида, ограниченного остатками 141–148 в αВ-кристаллине (GVLTVMGP), из-за чего эти белки могут взаимодействовать друг с другом [40]. В исследованиях на кардиомиобластах крысы H9C2 было установлено, что в состоянии покоя большая часть HspB5 находится в цитозоле и лишь около 23% этого белка связано с сократительным аппаратом, в то время как прогревание сопровождается перемещением 83% HspB5 на сократительный аппарат [41]. Эти результаты хорошо согласуются с ранее опубликованными данными, свидетельствующими о том, что различные стрессорные воздействия сопровождаются транслокацией HspB5 из цитозоля на сократительный аппарат, и при этом эффективность перемещения тем выше, чем тяжелее условия, вызывающие стресс [21, 42]. В случае миофибрилл сердца в мягких условиях гипоксии HspB5 сначала связывается с тонкими филаментами вблизи Z-диска, а в более жестких условиях гипоксии локализуется почти по всей длине тонкого филамента [42]. Более подробный анализ локализации HspB5 на актиновом филаменте привел к выводу о том, что в ходе гипоксии HspB5 перемещается на N2-линию тонкого филамента (рис. 1) и остается связанным даже после полной экстракции актина 1M NaSCN или 1M мочевиной. Эти факты свидетельствовали о том, что HspB5 преимущественно связывается с титином, который располагается вдоль актинового филамента [43]. Изучение взаимодействия HspB5 с титином показало, что малый белок теплового шока преимущественно связывается с иммуноглобу-

лин-подобными доменами I26 и I27 титина, а не с разупорядоченными PEVK-участками этого белка (рис. 1, таблица) [25, 44]. При дистрофии Лейдена (дистрофия и слабость проксимальных групп скелетных мышц) и при дилатационной кардиомиопатии HspB5 оказывается способным связываться и с PEVK-участками титина [25]. Тот факт, что в кардиомиоцитах при длительной гипоксии HspB5 связывается вдоль всего актинового филамента (аналогичная локализация характерна для миофибрилл скелетных мышц) [21], может свидетельствовать о том, что этот малый белок теплового шока, по-видимому, может связываться с различными иммуноглобулин-подобными доменами титина. Связывание HspB5 предотвращает чрезмерное растяжение и происходящую вследствие этого агрегацию титина. Вероятно, именно вследствие этого HspB5 способен предотвращать тяжелые повреждения сократительного аппарата кардиомиоцитов, вызываемые ишемией/реперфузией [36]. Завершая этот раздел, можно заключить, что взаимодействие HspB5 и HspB1 с актиновыми филаментами во многом похоже. Оба малых белка теплового шока обеспечивают стабилизацию тонких филаментов за счет взаимодействия с регуляторными минорными белками актинового филамента (титином, филамином, компонентами тропонина) или белками, взаимодействующими с актиновыми филаментами (например, белками промежуточных филаментов) [38].

## **МАЛЫЙ БЕЛОК ТЕПЛООВОГО ШОКА HspB6 (Hsp20) И ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С АКТИНОВЫМИ ФИЛАМЕНТАМИ**

В отличие от трёх ранее описанных белков (HspB1, HspB4, HspB5), которые представлены в виде очень крупных олигомеров, включающих в свой состав 24 и более субъединиц [16, 45], малый белок теплового шока HspB6 преимущественно представлен в виде димеров (таблица) [46, 47]. Этот белок склонен образовывать гетероолигомерные комплексы с HspB1 и HspB5 [48, 49] и преимущественно локализуется в цитозоле гладких и сердечных мышц [50, 51]. HspB6 может подвергаться фосфорилированию под действием cAMP- и cGMP-зависимых протеинкиназ по остатку Ser16, и этот процесс оказывает существенное влияние на функциональную активность этого белка. В случае кардиомиоцитов фосфорилирование HspB6 или введение короткого N-концевого пептида, содержащего фосфорилированный

остаток серина, ускоряет процесс расслабления [50, 52]. Принято считать, что индуцированное катехоламинами повышение концентрации сАМР приводит к фосфорилированию HspB6, который вместе с фосфорилированным ингибитором фосфатазы I типа ингибирует активность фосфатазы. Это приводит к увеличению степени фосфорилирования фосфоламбана, активирующего Са-АТФазу саркоплазматического ретикулула, и тем самым ускоряет расслабление сердечной мышцы [50, 52]. Таким образом, в этом случае фосфорилирование HspB6 сопровождается изменением одной из важных транспортных АТФаз, отвечающих за регуляцию сократительной активности сердца.

Нитровазодилататоры, такие как нитроглицерин, вызывали расслабление гладких мышц без существенного изменения уровня фосфорилирования легких цепей миозина, и этот эффект сопровождался фосфорилированием HspB6 [53]. При этом было обнаружено, что в структуре HspB6 есть пептид, первичная структура которого похожа на соответствующий пептид в структуре тропонина I [53]. Поэтому было высказано предположение, что фосфорилирование может влиять на ингибирующую активность этого участка HspB6. Параллельно с этим были получены данные, свидетельствующие в пользу того, что HspB6 может напрямую взаимодействовать с актином и  $\alpha$ -актинином и что фосфорилирование HspB6 ослабляет взаимодействие этого малого белка теплового шока с актином и компонентами актинового филамента [54, 55]. Были высказаны две противоречащих друг другу гипотезы, пытающиеся объяснить эффект фосфорилирования HspB6 на расслабление гладких мышц. Согласно первой гипотезе, располагающийся на актиновом филаменте HspB6 может ингибировать взаимодействие миозина с актином, и фосфорилирование усиливает ингибирующий эффект HspB6, что приводит к расслаблению [56, 57]. Согласно второй гипотезе, в нефосфорилированном состоянии HspB6 стабилизирует актиновые филаменты и их взаимодействие с актин-связывающими белками, а фосфорилирование HspB6 приводит к дестабилизации актиновых филаментов, их частичной деполимеризации и в конечном итоге приводит к расслаблению гладких мышц [54, 55, 58]. Несмотря на различный механизм, предлагаемый этими гипотезами, они обе базировались на предположении, что HspB6 является актин-связывающим белком. Мы пытались проверить это предположение и при этом оказалось, что HspB6 ни в фосфорилированном, ни в нефосфорилированном состоянии не способен прочно взаимодействовать ни с актиновыми

филаментами, ни с миофибриллами [59]. Это ставило под сомнение обе гипотезы. К тому же оказалось, что короткий пептид, содержащий фосфорилированный остаток Ser16 HspB6 и не способный напрямую связываться с актином, может вызывать расслабление различных типов гладких мышц [60, 61]. Подробный анализ этого эффекта позволил установить, что этот фосфорилированный пептид так же, как и полноразмерный фосфорилированный HspB6, взаимодействует со всеми семью изоформами универсального адаптерного белка 14-3-3 [62, 63]. Было высказано предположение, что фосфорилированный HspB6 прочно связывается с 14-3-3 и при этом вытесняет фосфорилированный кофилин, находившийся в комплексе с 14-3-3. Освободившийся фосфорилированный кофилин быстро подвергается дефосфорилированию под действием фосфатаз и вызывает деполимеризацию актина, следствием чего является расслабление гладких мышц [61]. Проверка этой привлекательной гипотезы показала ее несостоятельность. Оказалось, что фосфорилированный кофилин не способен взаимодействовать с 14-3-3, и поэтому расслабление гладких мышц, вызываемое фосфорилированным HspB6, не может быть связано с вытеснением кофилина из его комплекса с 14-3-3 [64]. Более вероятным представляется предположение о том, что фосфорилированный HspB6 вытесняет из комплекса с 14-3-3 не идентифицированные на сегодняшний день белки или ферменты (например, протеинкиназы или фосфатазы), которые тем или иным образом влияют либо на кофилин, либо на какие-то другие актин-связывающие белки [64]. Высказанное в последнее время предположение о том, что в сердечной мышце фосфорилированный HspB6 может участвовать в ремоделировании актиновых филаментов путем вытеснения фосфорилированного кофилина из его комплекса с 14-3-3 [65], представляется необоснованным и крайне маловероятным по причинам, описанным выше.

Завершая этот раздел, можно заключить, что HspB6 не является истинным актин-связывающим белком, и его влияние на актиновый цитоскелет может быть опосредовано взаимодействием с универсальным адаптерным белком 14-3-3.

### **РОЛЬ HspB7 (cvHsp) В ПОДДЕРЖАНИИ СТРУКТУРЫ И ЛОКАЛИЗАЦИИ АКТИНОВЫХ ФИЛАМЕНТОВ**

HspB7 был описан сравнительно недавно [66] и поэтому охарактеризован в меньшей степени по сравнению с другими представите-

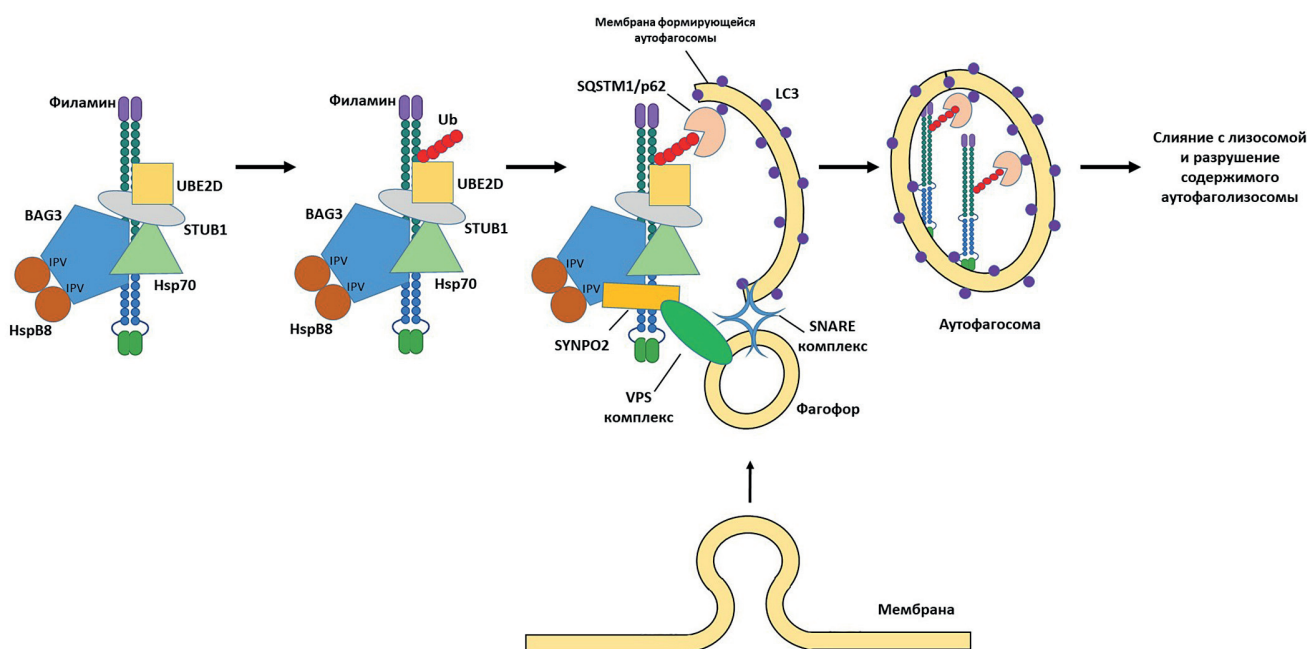
лями семейства малых белков теплового шока (таблица). Этот белок преимущественно синтезируется в сердце, скелетных мышцах и жировой ткани [5, 66]. В условиях *in vitro* рекомбинантный HspB7 представлен как в виде малых олигомеров (вероятно, димеров), так и очень крупных олигомеров [67]. Как и большинство других малых белков теплового шока, в нормальных условиях HspB7 в основном локализуется диффузно в цитозоле, а после различных стрессорных воздействий перемещается на сократительный аппарат [21]. Некоторые экспериментальные данные [68] свидетельствуют о том, что рекомбинантный HspB7, несущий His-метку, способен связываться как G-, так и с F-актином и влиять на скорость полимеризации актина [68]. Нам кажется, что представленные данные, полученные только с использованием метода дот-блота, недостаточно убедительны, и требуются дополнительные исследования для подтверждения прямого взаимодействия HspB7 с актином. В то же время нет сомнений в том, что этот белок играет исключительно важную роль в правильной сборке актиновых филаментов и их локализации в клетке. Установлено, что HspB7 прочно взаимодействует с С-концевым доменом филамина С, обеспечивающим его димеризацию [69]. Удаление 16 С-концевых а.о. филамина С предотвращает его связывание с HspB7 и сопровождается перемещением филамина С из области Z-диска в участки сократительного аппарата, наиболее подвергшиеся механическому растяжению (рис. 1, таблица) [69]. Нокаут гена *HspB7* приводит к увеличению синтеза филамина С и изменению внутриклеточной локализации саркогликанов  $\gamma$  и  $\delta$  без изменения локализации дистрофина [70]. В этой связи высказывается предположение о том, что HspB7 каким-то образом влияет на взаимодействие филамина С и белков дистрофинового комплекса [70]. С этим предположением согласуются данные, полученные на мышцах линии mdx, используемых при изучении мышечной дистрофии, сцепленной с X-хромосомой. В этом случае оказалось, что у таких мышечей увеличивается количество HspB7 в цитозоле и уменьшается количество дистрогликанов в примембранном слое [71, 72]. У мышечей с нокаутом гена *HspB7* в сердце не происходит значительных изменений структуры саркомеров, но выявляются значительные изменения в интеркалирующих дисках, увеличивается синтез филамина С, происходит изменение локализации N-кадгерина и десмоплакина, а также белков, участвующих в формировании интеркалирующих дисков [73]. Установлено, что в сердце HspB7 способен взаимодей-

вать с титином [74]. Уменьшение синтеза HspB7 сопровождается компенсаторным увеличением синтеза HspB5 и усилением аутофагии, а ингибирование аутофагии приводит к накоплению агрегатов филамина С [74]. Учитывая тот факт, что HspB7 способен взаимодействовать как с титином, так и с филамином С, высказывается предположение, что при большом растяжении филамин переходит из Z-диска на наиболее деформированные и растянутые участки титина, и HspB7 каким-то образом может участвовать в этом процессе [69]. Считается, что HspB7 играет важную роль в сборке актиновых филаментов в ходе развития сердца [68]. При анализе белкового состава мышц икроножной мышцы молодых (3 мес.) и старых (30 мес.) крыс было выявлено, что в ходе саркопении (возрастного изменения мышц) происходит значительное увеличение синтеза HspB7 [75]. Таким образом, можно заключить, что HspB7 взаимодействует с большим количеством различных актин-связывающих белков, может участвовать в сборке актиновых филаментов и поддержании их функциональной активности.

#### **HspB8 (Hsp22) И ШАПЕРОН-ЗАВИСИМАЯ ИЗБИРАТЕЛЬНАЯ АУТОФАГИЯ (CASA, CHAPERONE-ASSISTED SELECTIVE AUTOPHAGY)**

Малый белок теплового шока HspB8 экспрессируется практически во всех органах и тканях [5, 76]. В отличие от большинства малых белков теплового шока, HspB8 преимущественно представлен в виде мономеров и/или малых олигомеров [77]. Считается, что в отличие от других малых белков теплового шока, HspB8 слабо связывается с актиновыми филаментами, хотя миофибриллы все же прокрашиваются антителами на HspB8 [78]. Было установлено, что HspB8 взаимодействует с универсальным адаптерным белком Bag3 и шаперонная активность HspB8 целиком зависит от его способности связываться с Bag3 [79]. В структуре Bag3 есть 2 участка, содержащих консервативную последовательность IPV. Эти участки способны взаимодействовать с гидрофобным карманом, образованным  $\beta 4$ – $\beta 8$  складками  $\alpha$ -кристаллинового домена HspB8, обеспечивать формирование прочного комплекса между двумя белками и стабилизировать структуру внутренне разупорядоченного Bag3 [80, 81]. Позднее было показано, что Bag3 способен взаимодействовать и с другими малыми белками теплового шока, такими как HspB1, HspB2, HspB5 и HspB6, однако прочность комплексов, образованных эти-





**Рис. 2.** Схема образования аутофагосомы в клетке. Белки сократительного аппарата клетки (например, филамин) могут претерпевать частичную денатурацию или потерю активности во время физической работы или при стрессе. Такие нефункциональные белки разрушаются под действием мультишаперонного комплекса, формирующегося на основе белка-адаптера Bag3, выступающего в роли платформы для сборки. Несколько центров связывания (на схеме указаны как IPV) позволяют Bag3 привлекать HspB8, а другой участок Bag3 связывается с АТФ-зависимым шапероном Hsp70. В дальнейшем такой тройной комплекс взаимодействует с убиквитин-конъюгирующими ферментами STUB1 и UBE2D, которые переносят убиквитин (Ub) на белок-субстрат. Белковый комплекс, собранный на платформе Bag3, вместе с убиквитинированным субстратом участвует в индукции процесса шаперон-зависимой избирательной аутофагии (CASA). Мембрана формирующейся аутофагосомы содержит мембранный белок LC3, способный рекрутировать SQSTM1/p62. Такой комплекс привлекает белок-субстрат за счет взаимодействия SQSTM1/p62 с убиквитином. Рост аутофагосомы происходит за счет привлечения мембран фагофоров комплексом SYNPO2 и VPS, взаимодействующих с платформой Bag3, а их слияние с мембраной формирующейся аутофагосомы обеспечивается белковым комплексом SNARE. Разрушение белков-субстратов происходит после слияния аутофагосомы с лизосомой

ми белками с Bag3 много меньше прочности комплекса с HspB8, и поэтому в клетке именно HspB8 является истинным партнером Bag3 [82, 83]. Следует особо подчеркнуть, что Bag3 является универсальным адаптером, способным взаимодействовать со всеми белками теплового шока, белками ССТ (шаперонинами, относящимся к семейству Hsp60), Hsp70 и практически со всеми малыми белками теплового шока [84]. Вероятно, именно поэтому ингибирование синтеза Bag3 под действием малой интерферирующей РНК подавляет синтез правильно свернутого актина [84].

Bag3 является своеобразной платформой, на которой происходит сборка сложного белкового комплекса (рис. 2). С одной стороны, как уже отмечалось, Bag3 связывает HspB8. Используя другие центры, Bag3 взаимодействует с Hsp70 и ускоряет обмен адениловых нуклеотидов в активном центре Hsp70. С другой стороны, связавшийся с Bag3 Hsp70 взаимодействует со специфической убиквитин-лигазой STUB1, которая, в свою очередь, связывается с убиквитин-конъюгирующим ферментом UBE2D, убиквитинирующим белок-субстрат [85]. Убик-

витинирование белка-субстрата обеспечивает взаимодействие этого белкового комплекса с рецептором убиквитина SQSTM1/p62, расположенном на мембране фагофоров. Помимо этого, Bag3 взаимодействует с дополнительным адаптерным белком SYNPO2 (синаптоподином 2 или миоподином), который обеспечивает взаимодействие с белковым комплексом VPS [85]. Процесс завершается образованием аутофагосомы (рис. 2), в которой после слияния с лизосомой происходит избирательный убиквитин-зависимый протеолиз белка-мишени [86]. Весь этот белковый комплекс располагается вблизи Z-диска. При этом Bag3 связывается с доменами d19–d21 филамина, наиболее подверженным деформации в ходе избыточных мышечных сокращений, привлекает комплекс остальных белков и осуществляет протеолиз денатурированного филамина. Считается, что при этом Bag3 может освобождать факторы транскрипции YAP/TAZ из комплекса с ингибиторными белками, что приводит к активации синтеза филамина *de novo* [86, 87]. Весь этот сложный механизм находится под контролем и может регулироваться путем фосфорилирова-

ния под действием нескольких протеинкиназ. Например, протеинкиназа ST38 способна связываться с Bag3 и ингибировать зависящий от этого белка процесс аутофагии [88].

Зависящий от Bag3 и HspB8 процесс избирательного протеолиза играет важную роль не только в поддержании функциональной активности скелетных мышц, но и оказывается вовлеченным в ремоделирование актинового скелета различных клеток. Так, например, установлено, что ингибирование синтеза Bag3 и/или HspB8 сопровождается дезорганизацией актиновых филаментов, участвующих в правильной локализации митотического веретена, и нарушениями в распределении хромосом в ходе митоза [89]. Продолжение исследований в этом направлении показало, что ингибирование синтеза HspB8 приводит к уменьшению синтеза Bag3. Эти процессы приводят к замедлению цитокинеза, накоплению не полностью разделившихся после митоза клеток HeLa и клеток, содержащих несколько ядер [90]. Этот эффект может быть частично обращен соединениями, способствующими деполимеризации актина, что может означать, что в ходе митоза комплекс HspB8–Bag3 каким-то образом влияет либо на сборку актиновых филаментов, либо приводит к частичной деполимеризации актина [90]. Возможно, HspB8 стабилизирует структуру фосфорилированного Bag3, который взаимодействует с различными актин-связывающими белками (такими как CapZ, немышечный миозин II или Arp2/3), что может влиять на распределение и структуру актиновых филаментов. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что комплекс HspB8–Bag3 может связывать и ингибировать активность гистондеацетилазы 6 (HDAC6), которая способна деацетилировать актин-связывающий белок кортактин. Ацетилированная форма кортактина препятствует нормальному функционированию комплекса Arp2/3, ветвлению нитей актина и тем самым способствует нормальному протеканию митоза [91]. Как уже отмечалось, белковый комплекс, обеспечивающий протекание шаперон-зависимой избирательной аутофагии, сложно регулируется. С этим комплексом может связываться циклин-зависимая протеинкиназа CDK1, которая способна фосфорилировать Thr285 в структуре Bag3 и повышать его активность при митозе [92].

Завершая это раздел, можно заключить, что HspB8 образует прочный комплекс с многофункциональным белком Bag3 и таким образом может влиять на многочисленные процессы, протекающие в клетке и включающие в

себя не только ремоделирование цитоскелета и сократительного аппарата, но и процессы, связанные с метаболизмом углеводов и жирных кислот, энергетического обеспечения клетки, а также поддержания окислительно-восстановительного потенциала [93].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные свидетельствуют о том, что малые белки теплового шока играют важную роль в поддержании структуры и свойств актиновых филаментов. Стресс может сопровождаться частичной денатурацией актина. Концентрация актина в мышечных клетках очень высока и достигает миллимолярных величин. Малые белки теплового шока обладают шапероноподобной активностью и поэтому узнают и взаимодействуют с частично денатурированными белками. Вследствие того, что концентрация актина столь велика, стресс, вызывающий частичную денатурацию актина, будет неизбежно сопровождаться массовой миграцией sHsp из цитозоля на актиновый филамент. При этом концентрация sHsp несопоставимо мала по сравнению с концентрацией актина и поэтому малые белки теплового шока не способны непосредственно влиять на свойства актинового филамента. Не являясь истинными актин-связывающими белками, sHsp взаимодействуют с гигантскими эластичными актин-связывающими белками (титином, филамином), разнообразными регуляторными (тропонин) или адаптерными белками (14-3-3, Bag3) и таким образом опосредованно влияют на ремоделирование и целостность актиновых филаментов. Таким образом, механизм влияния малых белков теплового шока на актиновые филаменты много более сложен, чем представлялось ранее, и потребуются обширные дополнительные исследования для подробного анализа взаимодействия и влияния малых белков теплового шока на функционирование различных актин-связывающих белков.

**Вклад авторов.** Л.К.М. – подбор данных литературы; В.М.Ш. – подбор данных литературы, подготовка рисунков; Н.Б.Г. – обсуждение собранных данных и подготовка текста обзора.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-74-00013 (Л.К.М.), а также при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология» (Н.Б.Г.).

**Благодарности.** В 2022 году могло бы исполниться 80 лет Андрею Дмитриевичу Виноградову, который был одним из лидеров отечественной биоэнергетики, блестящим лектором и ярким критически мыслящим ученым. А.Д. Виноградов на протяжении десяти лет возглавлял кафедру биохимии и способствовал развитию исследований в области биохимии мышц и анализу процессов протеостаза.

Авторы посвящают эту работу светлой памяти этого замечательного ученого.

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

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Janowska, M. K., Baughman, H. E. R., Woods, C. N., and Klevit, R. E. (2019) Mechanisms of small heat shock proteins, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **11**, a034025, doi: 10.1101/cshperspect.a034025.
2. Riedl, M., Strauch, A., Catici, D. A. M., and Haslbeck, M. (2020) Proteinaceous transformers: Structural and functional variability of human sHsps, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 5448, doi: 10.3390/ijms21155448.
3. Kriehuber, T., Rattei, T., Weinmaier, T., Bepperling, A., Haslbeck, M., et al. (2010) Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins, *FASEB J.*, **24**, 3633-3642, doi: 10.1096/fj.10-156992.
4. Bourrelle-Langlois, M., Morrow, G., Finet, S., and Tanguay, R. M. (2016) *In vitro* structural and functional characterization of the small heat shock Proteins (sHSP) of the cyanophage S-ShM2 and its host, *Synechococcus* sp. WH7803, *PLoS One*, **11**, e0162233, doi: 10.1371/journal.pone.0162233.
5. Vos, M. J., Kanon, B., and Kampinga, H. H. (2009) HSPB7 is a SC35 speckle resident small heat shock protein, *Biochim. Biophys. Acta*, **1793**, 1343-1353, doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.05.005.
6. Kappé, G., Franck, E., Verschuere, P., Boelens, W. C., Leunissen, J. A., et al. (2003) The human genome encodes 10 alpha-crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10, *Cell Stress Chaperones*, **8**, 53-61, doi: 10.1379/1466-1268(2003)8<53:thgecs>2.0.co;2.
7. Fontaine, J. M., Rest, J. S., Welsh, M. J., and Benndorf, R. (2003) The sperm outer dense fiber protein is the 10th member of the superfamily of mammalian small stress proteins, *Cell Stress Chaperones*, **8**, 62-69, doi: 10.1379/1466-1268(2003)8<62:tsodfp>2.0.co;2
8. Cristofani, R., Piccolella, M., Crippa, V., Tedesco, B., Montagnani Marelli, M., et al. (2021) The role of HSPB8, a component of the chaperone-assisted selective autophagy machinery, in cancer, *Cells*, **10**, 335, doi: 10.3390/cells10020335.
9. Arrigo, A. P. (2013) Human small heat shock proteins: Protein interactomes of homo- and hetero-oligomeric complexes: an update, *FEBS Lett.*, **587**, 1959-1969, doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.011.
10. Xiong, J., Li, Y., Tan, X., and Fu, L. (2020) Small heat shock proteins in cancers: Functions and therapeutic potential for cancer therapy, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6611, doi: 10.3390/ijms21186611.
11. Wettstein, G., Bellaye, P. S., Micheau, O., and Bonniaud, P. (2012) Small heat shock proteins and the cytoskeleton: An essential interplay for cell integrity? *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **44**, 1680-1686, doi: 10.1016/j.biocel.2012.05.024.
12. Mounier, N., and Arrigo, A. P. (2002) Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: How do they interact? *Cell Stress Chaperones*, **7**, 167-176, doi: 10.1379/1466-1268(2002)007<0167:acashs>2.0.co;2.
13. Miron, T., Wilchek, M., and Geiger, B. (1988) Characterization of an inhibitor of actin polymerization in vinculin-rich fraction of turkey gizzard smooth muscle, *Eur. J. Biochem.*, **178**, 543-553, doi: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb14481.x.
14. Miron, T., Vancompernelle, K., Vandekerckhove, J., Wilchek, M., and Geiger, B. (1991) A 25-kDa inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein, *J. Cell Biol.*, **114**, 255-261, doi: 10.1083/jcb.114.2.255.
15. Benndorf, R., Hayess, K., Ryazantsev, S., Wieske, M., Behlke, J., et al. (1994) Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity, *J. Biol. Chem.*, **269**, 20780-20784.
16. Jovcevski, B., Kelly, M. A., Rote, A. P., Berg, T., Gastall, H. Y., et al. (2015) Phosphomimics destabilize Hsp27 oligomeric assemblies and enhance chaperone activity, *Chem. Biol.*, **22**, 186-195, doi: 10.1016/j.chembiol.2015.01.001.
17. Wieske, M., Benndorf, R., Behlke, J., Dolling, R., Grelle, G., et al. (2001) Defined sequence segments of the small heat shock proteins HSP25 and alphaB-crystallin inhibit actin polymerization, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 2083-2090, doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02082.x.
18. Panasencko, O. O., Kim, M. V., Marston, S. B., and Gusev, N. B. (2003) Interaction of the small heat shock protein with molecular mass 25 kDa (hsp25) with actin, *Eur. J. Biochem.*, **270**, 892-901, doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03449.x.
19. Pivovarova, A. V., Mikhailova, V. V., Chernik, I. S., Chebotareva, N. A., Levitsky, D. I., et al. (2005) Effects of small heat shock proteins on the thermal denaturation and aggregation of F-actin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **331**, 1548-1553, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.04.077.
20. Pivovarova, A. V., Chebotareva, N. A., Chernik, I. S., Gusev, N. B., and Levitsky, D. I. (2007) Small

- heat shock protein Hsp27 prevents heat-induced aggregation of F-actin by forming soluble complexes with denatured actin, *FEBS J.*, **274**, 5937-5948, doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06117.x.
21. Golenhofen, N., Perng, M. D., Quinlan, R. A., and Drenckhahn, D. (2004) Comparison of the small heat shock proteins alphaB-crystallin, MKBP, HSP25, HSP20, and cvHSP in heart and skeletal muscle, *Histochem. Cell Biol.*, **122**, 415-425, doi: 10.1007/s00418-004-0711-z.
  22. Lavoie, J. N., Hickey, E., Weber, L. A., and Landry, J. (1993) Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27, *J. Biol. Chem.*, **268**, 24210-24214.
  23. Lavoie, J. N., Lambert, H., Hickey, E., Weber, L. A., and Landry, J. (1995) Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27, *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 505-516, doi: 10.1128/MCB.15.1.505.
  24. Hu, X., Van Marion, D. M. S., Wiersma, M., Zhang, D., and Brundel, B. (2017) The protective role of small heat shock proteins in cardiac diseases: Key role in atrial fibrillation, *Cell Stress Chaperones*, **22**, 665-674, doi: 10.1007/s12192-017-0799-4.
  25. Kotter, S., Unger, A., Hamdani, N., Lang, P., Vorgerd, M., et al. (2014) Human myocytes are protected from titin aggregation-induced stiffening by small heat shock proteins, *J. Cell Biol.*, **204**, 187-202, doi: 10.1083/jcb.201306077.
  26. Tucker, N. R., and Shelden, E. A. (2009) Hsp27 associates with the titin filament system in heat-shocked zebrafish cardiomyocytes, *Exp. Cell Res.*, **315**, 3176-3186, doi: 10.1016/j.yexcr.2009.06.030.
  27. Lu, X. Y., Chen, L., Cai, X. L., and Yang, H. T. (2008) Overexpression of heat shock protein 27 protects against ischaemia/reperfusion-induced cardiac dysfunction via stabilization of troponin I and T, *Cardiovasc. Res.*, **79**, 500-508, doi: 10.1093/cvr/cvn091.
  28. Martinez-Laorden, E., Almela, P., Milanes, M. V., and Laorden, M. L. (2015) Expression of heat shock protein 27 and troponin T and troponin I after naloxone-precipitated morphine withdrawal, *Eur. J. Pharmacol.*, **766**, 142-150, doi: 10.1016/j.ejphar.2015.10.006.
  29. Collier, M. P., Alderson, T. R., de Villiers, C. P., Nicholls, D., Gastall, H. Y., et al. (2019) HspB1 phosphorylation regulates its intramolecular dynamics and mechanosensitive molecular chaperone interaction with filamin C, *Sci. Adv.*, **5**, eaav8421, doi: 10.1126/sciadv.aav8421.
  30. Clark, A. R., Vree Egberts, W., Kondrat, F. D. L., Hilton, G. R., Ray, N. J., et al. (2018) Terminal regions confer plasticity to the tetrameric assembly of human HspB2 and HspB3, *J. Mol. Biol.*, **430**, 3297-3310, doi: 10.1016/j.jmb.2018.06.047.
  31. Prabhu, S., Raman, B., Ramakrishna, T., and Rao, Ch. M. (2012) HspB2/myotonic dystrophy protein kinase binding protein (MKBP) as a novel molecular chaperone: Structural and functional aspects, *PLoS One*, **7**, e29810, doi: 10.1371/journal.pone.0029810.
  32. Morelli, F. F., Verbeek, D. S., Bertacchini, J., Vinet, J., Mediani, L., et al. (2017) Aberrant compartment formation by HSPB2 mislocalizes lamin A and compromises nuclear integrity and function, *Cell Rep.*, **20**, 2100-2115, doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.018.
  33. Tiago, T., Hummel, B., Morelli, F. F., Basile, V., Vinet, J., et al. (2021) Small heat-shock protein HSPB3 promotes myogenesis by regulating the lamin B receptor, *Cell Death Dis.*, **12**, 452, doi: 10.1038/s41419-021-03737-1.
  34. Shama, K. M., Suzuki, A., Harada, K., Fujitani, N., Kimura, H., et al. (1999) Transient up-regulation of myotonic dystrophy protein kinase-binding protein, MKBP, and HSP27 in the neonatal myocardium, *Cell Struct. Funct.*, **24**, 1-4, doi: 10.1247/csf.24.1.
  35. Morrison, L. E., Whittaker, R. J., Klepper, R. E., Wawrousek, E. F., and Glembotski, C. C. (2004) Roles for alphaB-crystallin and HSPB2 in protecting the myocardium from ischemia-reperfusion-induced damage in a KO mouse model, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **286**, H847-H855, doi: 10.1152/ajpheart.00715.2003.
  36. Pinz, I., Robbins, J., Rajasekaran, N. S., Benjamin, I. J., and Ingwall, J. S. (2008) Unmasking different mechanical and energetic roles for the small heat shock proteins CryAB and HSPB2 using genetically modified mouse hearts, *FASEB J.*, **22**, 84-92, doi: 10.1096/fj.07-8130com.
  37. Yoshida, K., Aki, T., Harada, K., Shama, K. M., Kamoda, Y., et al. (1999) Translocation of HSP27 and MKBP in ischemic heart, *Cell Struct. Funct.*, **24**, 181-185, doi: 10.1247/csf.24.181.
  38. Golenhofen, N., Redel, A., Wawrousek, E. F., and Drenckhahn, D. (2006) Ischemia-induced increase of stiffness of alphaB-crystallin/HSPB2-deficient myocardium, *Pflugers Arch.*, **451**, 518-525, doi: 10.1007/s00424-005-1488-1.
  39. Verschuure, P., Croes, Y., van den Ijssel, P. R., Quinlan, R. A., de Jong, W. W., et al. (2002) Translocation of small heat shock proteins to the actin cytoskeleton upon proteasomal inhibition, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **34**, 117-128, doi: 10.1006/jmcc.2001.1493.
  40. Wang, K., and Spector, A. (1996) alpha-Crystallin stabilizes actin filaments and prevents cytochalasin-induced depolymerization in a phosphorylation-dependent manner, *Eur. J. Biochem.*, **242**, 56-66, doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0056r.x.
  41. Singh, B. N., Rao, K. S., Ramakrishna, T., Rangaraj, N., and Rao, Ch. M. (2007) Association of alphaB-crystallin, a small heat shock protein, with actin: role in modulating actin filament dynamics *in vivo*, *J. Mol. Biol.*, **366**, 756-767, doi: 10.1016/j.jmb.2006.12.012.
  42. Golenhofen, N., Htun, P., Ness, W., Koob, R., Schaper, W., et al. (1999) Binding of the stress protein alpha B-crystallin to cardiac myofibrils correlates with the degree of myocardial

- al damage during ischemia/reperfusion *in vivo*, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **31**, 569-580, doi: 10.1006/jmcc.1998.0892.
43. Golenhofen, N., Arbeiter, A., Koob, R., and Drenckhahn, D. (2002) Ischemia-induced association of the stress protein alpha B-crystallin with I-band portion of cardiac titin, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **34**, 309-319, doi: 10.1006/jmcc.2001.1513.
  44. Bullard, B., Ferguson, C., Minajeva, A., Leake, M. C., Gautel, M., et al. (2004) Association of the chaperone alphaB-crystallin with titin in heart muscle, *J. Biol. Chem.*, **279**, 7917-7924, doi: 10.1074/jbc.M307473200.
  45. Kaiser, C. J. O., Peters, C., Schmid, P. W. N., Stavropoulou, M., Zou, J., et al. (2019) The structure and oxidation of the eye lens chaperone alphaA-crystallin, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 1141-1150, doi: 10.1038/s41594-019-0332-9.
  46. Bukach, O. V., Seit-Nebi, A. S., Marston, S. B., and Gusev, N. B. (2004) Some properties of human small heat shock protein Hsp20 (HspB6), *Eur. J. Biochem.*, **271**, 291-302, doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03928.x.
  47. Weeks, S. D., Baranova, E. V., Heirbaut, M., Beelen, S., Shkumatov, A. V., et al. (2014) Molecular structure and dynamics of the dimeric human small heat shock protein HSPB6, *J. Struct. Biol.*, **185**, 342-354, doi: 10.1016/j.jsb.2013.12.009.
  48. Bukach, O. V., Glukhova, A. E., Seit-Nebi, A. S., and Gusev, N. B. (2009) Heterooligomeric complexes formed by human small heat shock proteins HspB1 (Hsp27) and HspB6 (Hsp20), *Biochim. Biophys. Acta*, **1794**, 486-495, doi: 10.1016/j.bbapap.2008.11.010.
  49. Shatov, V. M., Strelkov, S. V., and Gusev, N. B. (2020) The Heterooligomerization of human small heat shock proteins is controlled by conserved motif located in the N-terminal domain, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 4248, doi: 10.3390/ijms21124248.
  50. Pipkin, W., Johnson, J. A., Creazzo, T. L., Burch, J., Komalavilas, P., et al. (2003) Localization, macromolecular associations, and function of the small heat shock-related protein HSP20 in rat heart, *Circulation*, **107**, 469-476, doi: 10.1161/01.cir.0000044386.27444.5a.
  51. Tyson, E. K., Macintyre, D. A., Smith, R., Chan, E. C., and Read, M. (2008) Evidence that a protein kinase A substrate, small heat-shock protein 20, modulates myometrial relaxation in human pregnancy, *Endocrinology*, **149**, 6157-6165, doi: 10.1210/en.2008-0593.
  52. Vafiadaki, E., Arvanitis, D. A., Sanoudou, D., and Kranias, E. G. (2013) Identification of a protein phosphatase-1/phospholamban complex that is regulated by cAMP-dependent phosphorylation, *PLoS One*, **8**, e80867, doi: 10.1371/journal.pone.0080867.
  53. Rembold, C. M., Foster, D. B., Strauss, J. D., Wingard, C. J., and Eyk, J. E. (2000) cGMP-mediated phosphorylation of heat shock protein 20 may cause smooth muscle relaxation without myosin light chain dephosphorylation in swine carotid artery, *J. Physiol.*, **524 Pt 3**, 865-878, doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.00865.x.
  54. Brophy, C. M., Lamb, S., and Graham, A. (1999) The small heat shock-related protein-20 is an actin-associated protein, *J. Vasc. Surg.*, **29**, 326-333, doi: 10.1016/s0741-5214(99)70385-x.
  55. Tessier, D. J., Komalavilas, P., Panitch, A., Joshi, L., and Brophy, C. M. (2003) The small heat shock protein (HSP) 20 is dynamically associated with the actin cross-linking protein actinin, *J. Surg. Res.*, **111**, 152-157, doi: 10.1016/s0022-4804(03)00113-6.
  56. Meeks, M. K., Ripley, M. L., Jin, Z., and Rembold, C. M. (2005) Heat shock protein 20-mediated force suppression in forskolin-relaxed swine carotid artery, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **288**, C633-C639, doi: 10.1152/ajpcell.00269.2004.
  57. Rembold, C. M. (2007) Force suppression and the crossbridge cycle in swine carotid artery, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **293**, C1003-1009, doi: 10.1152/ajpcell.00091.2007.
  58. Ba, M., Singer, C. A., Tyagi, M., Brophy, C., Baker, J. E., et al. (2009) HSP20 phosphorylation and airway smooth muscle relaxation, *Cell Health Cytoskelet.*, **2009**, 27-42, doi: 10.2147/chc.s5783.
  59. Bukach, O. V., Marston, S. B., and Gusev, N. B. (2005) Small heat shock protein with apparent molecular mass 20 kDa (Hsp20, HspB6) is not a genuine actin-binding protein, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **26**, 175-181, doi: 10.1007/s10974-005-9008-7.
  60. Woodrum, D., Pipkin, W., Tessier, D., Komalavilas, P., and Brophy, C. M. (2003) Phosphorylation of the heat shock-related protein, HSP20, mediates cyclic nucleotide-dependent relaxation, *J. Vasc. Surg.*, **37**, 874-881, doi: 10.1067/mva.2003.153.
  61. Dreiza, C. M., Komalavilas, P., Furnish, E. J., Flynn, C. R., Sheller, M. R., et al. (2010) The small heat shock protein, HSPB6, in muscle function and disease, *Cell Stress Chaperones*, **15**, 1-11, doi: 10.1007/s12192-009-0127-8.
  62. Dreiza, C. M., Brophy, C. M., Komalavilas, P., Furnish, E. J., Joshi, L., et al. (2005) Transducible heat shock protein 20 (HSP20) phosphopeptide alters cytoskeletal dynamics, *FASEB J.*, **19**, 261-263, doi: 10.1096/fj.04-2911fje.
  63. Chernik, I. S., Seit-Nebi, A. S., Marston, S. B., and Gusev, N. B. (2007) Small heat shock protein Hsp20 (HspB6) as a partner of 14-3-3gamma, *Mol. Cell. Biochem.*, **295**, 9-17, doi: 10.1007/s11010-006-9266-8.
  64. Sudnitsyna, M. V., Seit-Nebi, A. S., and Gusev, N. B. (2012) Cofilin weakly interacts with 14-3-3 and therefore can only indirectly participate in regulation of cell motility by small heat shock protein HspB6 (Hsp20), *Arch. Biochem. Biophys.*, **521**, 62-70, doi: 10.1016/j.abb.2012.03.010.
  65. Vafiadaki, E., Arvanitis, D. A., Eliopoulos, A. G., Kranias, E. G., and Sanoudou, D. (2020) The cardioprotective PKA-mediated Hsp20 phosphorylation modulates protein associations regulating cytoskeletal dynamics, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 9572, doi: 10.3390/ijms21249572.
  66. Krief, S., Faivre, J. F., Robert, P., Le Douarin, B., Brument-Larignon, N., et al. (1999) Identification

- and characterization of cvHsp. A novel human small stress protein selectively expressed in cardiovascular and insulin-sensitive tissues, *J. Biol. Chem.*, **274**, 36592-36600, doi: 10.1074/jbc.274.51.36592.
67. Muranova, L. K., Shatov, V. M., Slushchev, A. V., and Gusev, N. B. (2021) Quaternary structure and hetero-oligomerization of recombinant human Small heat shock protein HspB7 (cvHsp), *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 7777, doi: 10.3390/ijms22157777.
  68. Wu, T., Mu, Y., Bogomolovas, J., Fang, X., Veevers, J., et al. (2017) HSPB7 is indispensable for heart development by modulating actin filament assembly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 11956-11961, doi: 10.1073/pnas.1713763114.
  69. Schuld, J., Orfanos, Z., Chevessier, F., Eggers, B., Heil, L., et al. (2020) Homozygous expression of the myofibrillar myopathy-associated p. W2710X filamin C variant reveals major pathomechanisms of sarcomeric lesion formation, *Acta Neuropathol. Commun.*, **8**, 154, doi: 10.1186/s40478-020-01001-9.
  70. Juo, L. Y., Liao, W. C., Shih, Y. L., Yang, B. Y., Liu, A. B., et al. (2016) HSPB7 interacts with dimerized FLNC and its absence results in progressive myopathy in skeletal muscles, *J. Cell Sci.*, **129**, 1661-1670, doi: 10.1242/jcs.179887.
  71. Doran, P., Martin, G., Dowling, P., Jockusch, H., and Ohlendieck, K. (2006) Proteome analysis of the dystrophin-deficient MDX diaphragm reveals a drastic increase in the heat shock protein cvHSP, *Proteomics*, **6**, 4610-4621, doi: 10.1002/pmic.200600082.
  72. Lewis, C., Carberry, S., and Ohlendieck, K. (2009) Proteomic profiling of x-linked muscular dystrophy, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **30**, 267-269, doi: 10.1007/s10974-009-9197-6.
  73. Liao, W. C., Juo, L. Y., Shih, Y. L., Chen, Y. H., and Yan, Y. T. (2017) HSPB7 prevents cardiac conduction system defect through maintaining intercalated disc integrity, *PLoS Genet.*, **13**, e1006984, doi: 10.1371/journal.pgen.1006984.
  74. Mercer, E. J., Lin, Y. F., Cohen-Gould, L., and Evans, T. (2018) Hspb7 is a cardioprotective chaperone facilitating sarcomeric proteostasis, *Dev. Biol.*, **435**, 41-55, doi: 10.1016/j.ydbio.2018.01.005.
  75. Doran, P., Gannon, J., O'Connell, K., and Ohlendieck, K. (2007) Aging skeletal muscle shows a drastic increase in the small heat shock proteins alphaB-crystallin/HspB5 and cvHsp/HspB7, *Eur. J. Cell Biol.*, **86**, 629-640, doi: 10.1016/j.ejcb.2007.07.003.
  76. Acunzo, J., Katsogiannou, M., and Rocchi, P. (2012) Small heat shock proteins HSP27 (HspB1), alphaB-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **44**, 1622-1631, doi: 10.1016/j.biocel.2012.04.002.
  77. Shatov, V. M., Sluchanko, N. N., and Gusev, N. B. (2021) Replacement of Arg in the conserved N-terminal RLFDQxFG motif affects physico-chemical properties and chaperone-like activity of human small heat shock protein HspB8 (Hsp22), *PLoS One*, **16**, e0253432, doi: 10.1371/journal.pone.0253432.
  78. Ke, L., Meijering, R. A., Hoogstra-Berends, F., Mackovicova, K., Vos, M. J., et al. (2011) HSPB1, HSPB6, HSPB7 and HSPB8 protect against RhoA GTPase-induced remodeling in tachypaced atrial myocytes, *PLoS One*, **6**, e20395, doi: 10.1371/journal.pone.0020395.
  79. Carra, S., Seguin, S. J., Lambert, H., and Landry, J. (2008) HspB8 chaperone activity toward poly(Q)-containing proteins depends on its association with Bag3, a stimulator of macroautophagy, *J. Biol. Chem.*, **283**, 1437-1444, doi: 10.1074/jbc.M706304200.
  80. Fuchs, M., Poirier, D. J., Seguin, S. J., Lambert, H., Carra, S., et al. (2009) Identification of the key structural motifs involved in HspB8/HspB6-Bag3 interaction, *Biochem. J.*, **425**, 245-255, doi: 10.1042/BJ20090907.
  81. Shemetov, A. A. and Gusev, N. B. (2011) Biochemical characterization of small heat shock protein HspB8 (Hsp22)-Bag3 interaction, *Arch. Biochem. Biophys.*, **513**, 1-9, doi: 10.1016/j.abb.2011.06.014.
  82. Morelli, F. F., Mediani, L., Heldens, L., Bertacchini, J., Bigi, I., et al. (2017) An interaction study in mammalian cells demonstrates weak binding of HSPB2 to BAG3, which is regulated by HSPB3 and abrogated by HSPB8, *Cell Stress Chaperones*, **22**, 531-540, doi: 10.1007/s12192-017-0769-x.
  83. Rauch, J. N., Tse, E., Freilich, R., Mok, S. A., Makley, L. N., et al. (2017) BAG3 is a modular, scaffolding protein that physically links heat shock protein 70 (Hsp70) to the small heat shock proteins, *J. Mol. Biol.*, **429**, 128-141, doi: 10.1016/j.jmb.2016.11.013.
  84. Fontanella, B., Birolo, L., Infusini, G., Cirulli, C., Marzullo, L., et al. (2010) The co-chaperone BAG3 interacts with the cytosolic chaperonin CCT: New hints for actin folding, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **42**, 641-650, doi: 10.1016/j.biocel.2009.12.008.
  85. Ulbricht, A., Gehlert, S., Leciejewski, B., Schiffer, T., Bloch, W., et al. (2015) Induction and adaptation of chaperone-assisted selective autophagy CASA in response to resistance exercise in human skeletal muscle, *Autophagy*, **11**, 538-546, doi: 10.1080/15548627.2015.1017186.
  86. Ulbricht, A., Eppler, F. J., Tapia, V. E., van der Ven, P. F., Hampe, N., et al. (2013) Cellular mechano-transduction relies on tension-induced and chaperone-assisted autophagy, *Curr. Biol.*, **23**, 430-435, doi: 10.1016/j.cub.2013.01.064.
  87. Arndt, V., Dick, N., Tawo, R., Dreiseidler, M., Wenzel, D., et al. (2010) Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance, *Curr. Biol.*, **20**, 143-148, doi: 10.1016/j.cub.2009.11.022.
  88. Klimek, C., Jahnke, R., Wordehoff, J., Kathage, B., Stadel, D., et al. (2019) The Hippo network kinase STK38 contributes to protein homeostasis by inhibiting BAG3-mediated autophagy, *Biochim. Biophys. Acta*, **1866**, 1556-1566, doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.07.007.
  89. Fuchs, M., Luthold, C., Guilbert, S. M., Varlet, A. A., Lambert, H., et al. (2015) A role for the chaperone complex BAG3-HSPB8 in actin dynamics, spindle orientation and proper chromosome

- segregation during mitosis, *PLoS Genet.*, **11**, e1005582, doi: 10.1371/journal.pgen.1005582.
90. Varlet, A. A., Fuchs, M., Luthold, C., Lambert, H., Landry, J., et al. (2017) Fine-tuning of actin dynamics by the HSPB8-BAG3 chaperone complex facilitates cytokinesis and contributes to its impact on cell division, *Cell Stress Chaperones*, **22**, 553-567, doi: 10.1007/s12192-017-0780-2.
91. Luthold, C., Varlet, A. A., Lambert, H., Bordeleau, F., and Lavoie, J. N. (2020) Chaperone-assisted mitotic actin remodeling by BAG3 and HSPB8 involves the deacetylase HDAC6 and its substrate cortactin, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, doi: 10.3390/ijms22010142.
92. Luthold, C., Lambert, H., Guilbert, S. M., Rodrigue, M. A., Fuchs, M., et al. (2021) CDK1-mediated phosphorylation of BAG3 promotes mitotic cell shape remodeling and the molecular assembly of mitotic p62 bodies, *Cells*, **10**, doi: 10.3390/cells10102638.
93. Wu, W., Sun, X., Shi, X., Lai, L., Wang, C., et al. (2021) Hsp22 deficiency induces age-dependent cardiac dilation and dysfunction by impairing autophagy, metabolism, and oxidative response, *Antioxidants*, **10**, 1550, doi: 10.3390/antiox10101550.

## PARTICIPATION OF SMALL HEAT SHOCK PROTEINS IN REMODELING OF ACTIN MICROFILAMENTS

### Review

L. K. Muranova, V. M. Shatov, and N. B. Gusev\*

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,  
119991 Moscow, Russian Federation; e-mail: NBGusev@mail.ru*

Small heat shock proteins (sHsp) play important role in maintaining proteome stability and particularly in stabilization of cytoskeleton and contractile apparatus of the cell. Different kinds of stresses are accompanied by translocation of sHsp on actin filaments and therefore it is widely believed that the small heat shock proteins are true (genuine) actin-binding proteins. Investigations of last years have shown imperfection and incorrectness of this view point. Stress-induced translocation of sHsp to actin filaments are not induced by direct interaction of these proteins, but is the result of interaction of different actin-binding proteins with sHsp. HspB1 and HspB5 interact with giant elastic proteins titin and filamin and by this means provide integrity of contractile apparatus and its proper localization in the cell. HspB6 interacts with universal adapter proteins 14-3-3 and by this way only indirectly affects actin filament structure. HspB7 interacts with filamin C and controls actin filament assembling. HspB8 forms tight complex with universal regulatory and adapter protein Bag3 and participates in chaperone-assisted selective autophagy (CASA) of different actin-binding proteins (for example, filamin) as well as in actin-depending processes running in mitoses. Thus, the mechanisms underlying participation of sHsp in maintaining of contractile apparatus and cytoskeleton are much more complicate and diverse than postulated earlier. The old hypothesis postulating direct interaction of sHsp with intact actin should be revised and further detailed investigations concerning interaction of sHsp with minor proteins participating in formation and remodeling of actin filaments are required.

*Keywords:* small heat shock proteins, actin, protein-protein interactions, chaperone-like activity, phosphorylation