

СТРУКТУРНАЯ ДИНАМИКА, СТАБИЛЬНОСТЬ И ФОЛДИНГ БЕЛКОВ

© И. М. Кузнецова,¹ В. Форже,² К. К. Туроверов¹

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия,
и ² Отдел молекулярной и структурной биологии Комиссариата по атомной энергии,
Гренобль, 38054, Франция; ¹ электронный адрес: kkt@mail.cytspb.rssi.ru*

В работе дан обзор современных представлений о фолдинге белков *in vitro*, согласно которым аминокислотная последовательность белка, возникшая в результате эволюционного отбора, такова, что в ней запрограммированы структура нативного состояния, путь ее достижения и существование свободно-энергетического барьера между нативным и денатурированными состояниями белка. Последнее означает, что макромолекула белка может находиться либо в нативном, либо в денатурированном состоянии. При этом все макромолекулы нативного белка идентичны, если не считать флуктуаций структуры, обусловленных броуновским движением входящих в их состав атомов. Идентичность всех молекул белка в нативном состоянии исключительно важна для их правильного функционирования. Обсуждается зависимость стабильности белка, мерой которой является разность свободных энергий белка в нативном и денатурированном состояниях, от температуры и концентрации денатуранта. Рассмотрены существующие подходы, позволяющие характеризовать переходное состояние и ядро сворачивания. Обсуждается роль промежуточных и неправильно свернутых состояний в образовании аморфных агрегатов и амилоидных фибрилл.

Ключевые слова: фолдинг белков, равновесная динамика белков, промежуточные состояния, переходное состояние, ядро сворачивания, амилоидные фибриллы, стабильность белков.

Белки — один из основных компонентов всех живых организмов. Они выполняют в клетке и в живом организме в целом самые разнообразные функции — строительные, транспортные, каталитические и регуляторные, они обеспечивают движение, передачу сигналов, запасание энергии и т. д. Белок является гетерополимером, свернутым в уникальную третичную структуру, мономерными звеньями которого являются аминокислоты. Имеется двадцать основных наиболее часто встречающихся аминокислот. Подобно тому как из небольшого числа букв алфавита образуется бесчисленное множество слов, так и из двадцати основных аминокислот может образовываться огромное число белков. Последовательность аминокислот в белковой цепи и ее длина кодируются генами.

Процесс образования белков в клетке состоит из двух этапов — биосинтеза полипептидной цепи и ее сворачивания в нативную трехмерную структуру (рис. 1). Первый процесс — передача информации о последовательности и числе аминокислот, хранящейся в ДНК, и сборка необходимых аминокислот в полипептидную цепь с образованием первичной структуры белка, хотя и является очень сложным, к настоящему времени хорошо изучен. На этом этапе на основании информации, закодированной в одномерной ДНК, строится одномерная полипептидная цепь белка. На втором этапе происходит фолдинг — сворачивание цепочки аминокислот, из которых образован данный белок и которые определяют его первичную структуру, в уникальную трехмерную структуру. Только после сворачивания в уникальное компактное, высокоорганизованное нативное состояние белок становится функционально активным.

Первичная структура белка определяет его нативную пространственную структуру и путь сворачивания

Несмотря на то что в клетке имеется много факторов, вовлеченных в процесс фолдинга полипептидной цепи, можно считать установленным то обстоятельство, что код, согласно которому полипептидная цепь сворачивается в уникальную третичную структуру, заключен в аминокислотной последовательности самой полипептидной цепи (Radford, 2000; Финкельштейн, Птицын, 2002). Впервые это было продемонстрировано в работах Анфинсена (см., например: Anfinsen, 1973), показавшего экспериментально, что рибонуклеаза А, денатурированная мочевиной, в присутствии агента, разрушающего S—S-связи, восстанавливает полностью нативную структуру и ферментативную активность после удаления денатуранта и агента, разрушающего S—S-связи. За эту работу Анфинсен был удостоен Нобелевской премии. В последующем способность к ренатурации была показана для ряда других однодоменных белков относительно небольшого размера (Baldwin, Rose, 1999). Тем самым было доказано, что пространственная структура нативного состояния макромолекулы белка запрограммирована в его первичной структуре. При этом важно подчеркнуть, что принципы кодировки нативной пространственной структуры белка принципиально отличаются от принципа кодировки его аминокислотной последовательности (рис. 1). При синтезе белка последовательно, шаг за шагом считывается информация, закодированная в нуклеотидах, и

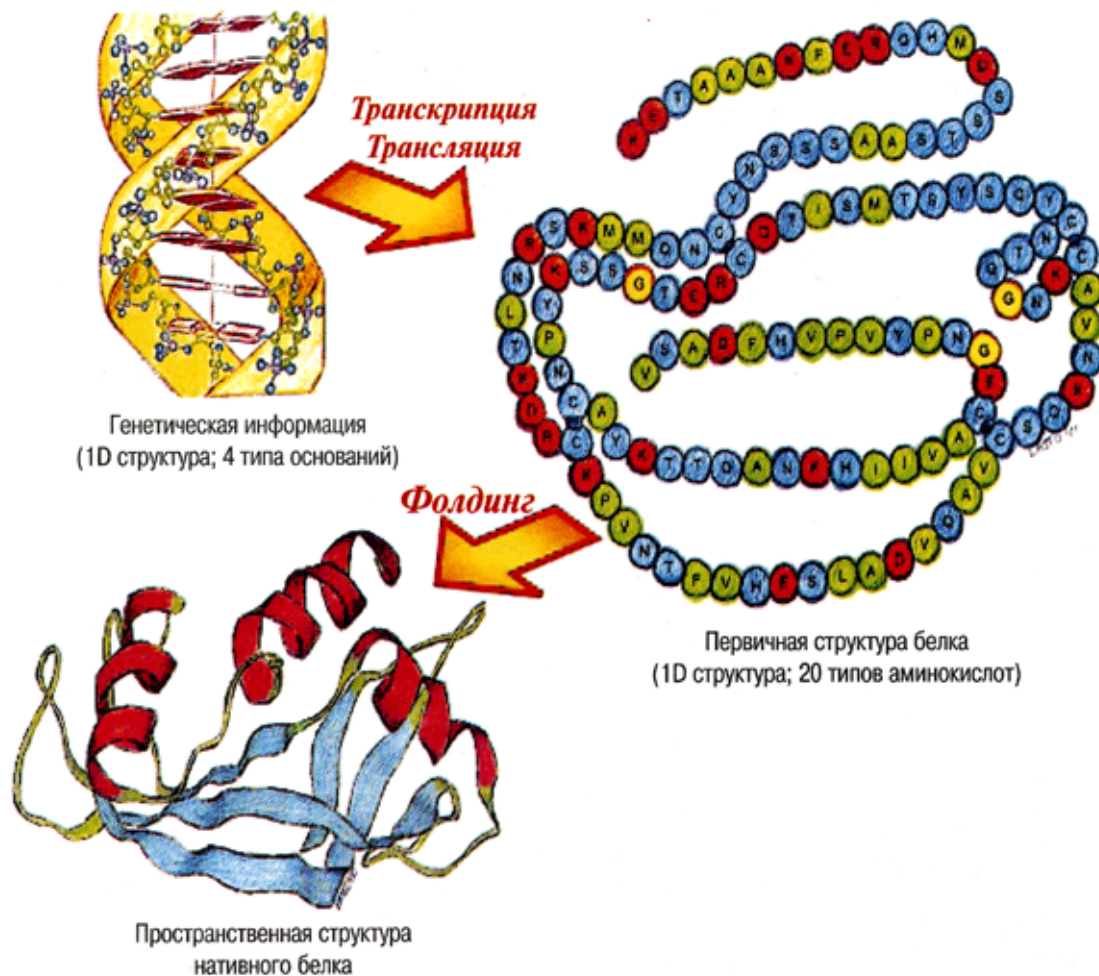


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая место фолдинга белка в процессе биосинтеза.

Следует обратить внимание на то, что в процессе транскрипции и трансляции информация, закодированная в одномерной (1D) структуре ДНК, используется для построения одномерной первичной структуры белка, а при фолдинге на основании информации, закодированной в одномерной первичной последовательности белка, строится его нативная трехмерная структура (по: Plotkin, Onuchic, 2002, с модификациями).

одна за другой собираются в полипептидную цепь соответствующие аминокислоты, т. е. одномерная информация, заключенная в нуклеотидной последовательности ДНК, трансформируется в одномерную же информацию о последовательности аминокислот первичной структуры белка. При фолдинге белка пошаговый механизм передачи информации явно не работает. В определении контактов, возникающих в третичной пространственной структуре макромолекулы белка, участвуют удаленные друг от друга по цепи аминокислотные остатки. При этом определяющую роль в фолдинге белка играют лишь некоторые (далеко не все) аминокислотные остатки. По этой причине гомологичные белки (иногда с достаточно низкой гомологией) имеют сходную структуру. С другой стороны, одна-единственная аминокислотная замена может существеннейшим образом сказаться на скорости сворачивания или даже полностью нарушить правильное сворачивание белка (Финкельштейн, Птицын, 2002; Plotkin, Onuchic, 2002).

Мерой стабильности структуры белка является свободная энергия $F = H - TS$, которая определяется его энтальпией H , т. е. энергией взаимодействия атомов белка, и его энтропией $S = R \ln N$ (R — молярная газовая постоянная, T — абсолютная температура), являющейся мерой

числа конформаций N , которыми данное состояние белка может быть реализовано. Способность белка самопроизвольно сворачиваться в нативное состояние означает, что этому состоянию белка отвечает минимум свободной энергии системы белок—растворитель. Дело в том, что одним из основных факторов, определяющих стабильность структуры белка, являются гидрофобные взаимодействия, т. е. стремление неполярных групп белка уйти из водного окружения, поскольку при этом происходит освобождение молекул воды, образующих вокруг неполярных групп белка льдоподобные упорядоченные структуры. Образование гидрофобного ядра макромолекулы белка приводит к существенному уменьшению свободной энергии системы белок—растворитель за счет возрастания энтропии растворителя.

Сворачивание белка заключается в поиске уникальной нативной структуры, отвечающей минимуму свободной энергии, среди большого числа конформаций, которые может принимать полипептидная цепь за счет поворотной изомеризации относительно связей $N-C_{\alpha}$ (угол ϕ), $C_{\alpha}-C$ (угол ψ) и $C-N$ (угол ω) (рис. 2). Однако жесткость пептидной связи не допускает вращения вокруг связи $C-N$. Атомы, входящие в пептидную связь,

лежат в одной плоскости в трансконформации (рис. 2). Исключение составляет пептидная связь, предшествующая остатку пролина. В нативном белке часть пептидных связей в этом случае имеет цисконформацию. Энергетические барьеры между шестью конформациями полипептидной цепи, отвечающими минимуму свободной энергии по углам ϕ и ψ , составляют около 1 ккал/моль, т. е. близки к энергии тепловых колебаний (0.6 ккал/моль). Поэтому поворотная изомеризация относительно связей $N-C_\alpha$ и $C_\alpha-C$ обеспечивает возможность существования огромного числа конформаций основной цепи белка в развернутом состоянии. Возможно практически свободное вращение относительно этих связей.

Простой расчет показывает, что даже для небольшого белка из ста аминокислотных остатков потребуется биллион лет, для того чтобы найти нативную структуру, если сворачивание будет осуществляться за счет произвольного перебора всех возможных конформаций (Levinthal, 1968). Тот факт, что сворачивание белка в состояние, отвечающее минимуму свободной энергии, происходит за очень короткий промежуток времени (который обычно составляет доли секунды), известен как «парадокс Левинтала». Это сделало очевидным, что в аминокислотной последовательности запрограммирована не только структура нативного состояния макромолекулы белка, но и путь его достижения.

Особенности фолдинга белков в клетке

Фолдинг белков в живой клетке осложнен по крайней мере двумя факторами. Во-первых, фолдинг белка всегда сопряжен с его синтезом. Сходящая с рибосомы полипептидная цепь сразу начнет сворачиваться. Если это небольшой α -спиральный белок, то сворачивание полипептидной цепи происходит по мере ее роста (котрансляционное сворачивание). Однако это не всегда так, и существует опасность возникновения неправильных внутримолекулярных контактов. Кроме того, сходя с рибосомы, полипептидная цепь сразу попадает в «густонаселенную» физиологическую среду клетки. При этом очень велика опасность образования нежелательных контактов с «соседями» (Ellis, Hartl, 1999; Radford, 2000). Поэтому для правильного сворачивания белков в этих условиях им необходимы помощники. Такими помощниками являются шапероны (Gilbert, 1994; Hartl, Martin, 1995; Csermely et al., 1998; Netzer, Hartl, 1998) и ферменты, ответственные за цис-трансизомеризацию пролина (Schmid, 2002) и образование «правильных» дисульфидных мостиков (Bader, Bardwell, 2002). Шапероны представляют собой обширный класс белков, различающихся по молекулярной массе, структуре и функции. Они способствуют котрансляционному сворачиванию полипептидных цепей, что особенно важно при синтезе больших мультидоменных белков, препятствуют агрегации денатурированных белков, ускоряют процесс перехода белка из промежуточного в нативное состояние, участвуют в транспорте белков к местам их назначения, в частности обеспечивают перенос белков через мембраны (Radford, 2000; Chen et al., 2001). Необходимо подчеркнуть, что наличие помощников при фолдинге белка в клетке отнюдь не противоречит фундаментальному заключению, сделанному на основании экспериментов,

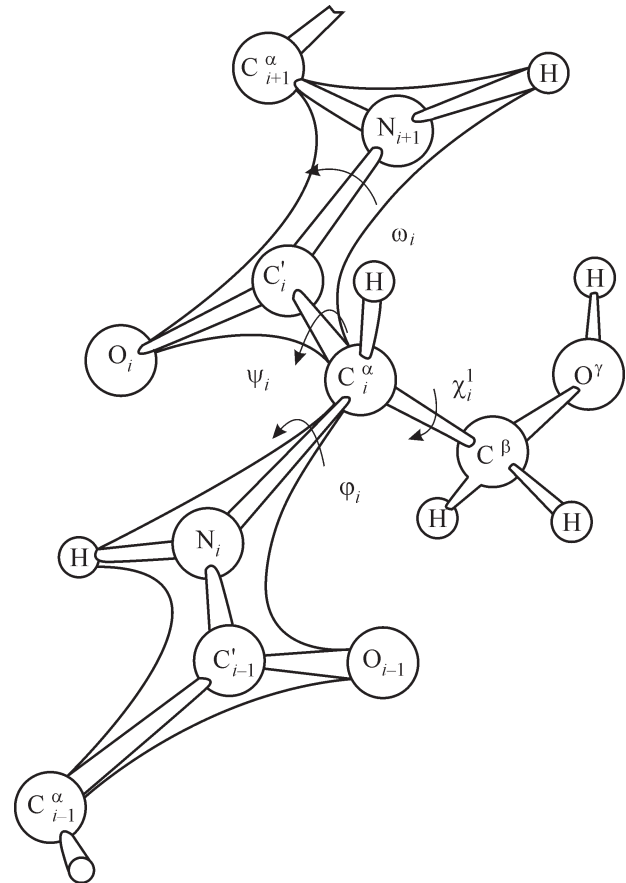


Рис. 2. Схема, иллюстрирующая планарность пептидной связи. Пояснения см. в тексте.

выполненных *in vitro*, о том, что структура нативного состояния белка и путь ее достижения закодированы в его первичной структуре.

Одностадийное кооперативное сворачивание небольших белков

Вопрос о том, как же белки сворачиваются в уникальное компактное, высокоорганизованное, функционально активное состояние, является в настоящее время одним из центральных вопросов структурной и клеточной биологии. Решение проблемы фолдинга лежит на стыке биологии, физики и химии, и нет другой области исследований, где бы эти науки так перекрывались (Fersht, 1998; Финкельштейн, Птицын, 2002). Основным подходом к решению этой проблемы является изучение процессов сворачивания—разворачивания белков *in vitro* с использованием различных физических методов, дающих информацию о структуре белка.

Методы малоуглового рассеяния рентгеновских лучей, седиментации, вискозиметрии и проникающей гель-хроматографии дают информацию о размерах и форме макромолекулы, методы кругового дихроизма в дальней УФ-области и ИФ-спектроскопии — о вторичной структуре белка, круговой дихроизм в ближней УФ-области спектра и собственная флуоресценция — о третичной структуре белка (Goldbeck et al., 1997; Fersht, 1998; Pollack, 1999; Roder, Shastry, 1999; Eaton et al., 2000; Kuznetsova et al., 2002, 2004; Arai et al., 2003; Do-

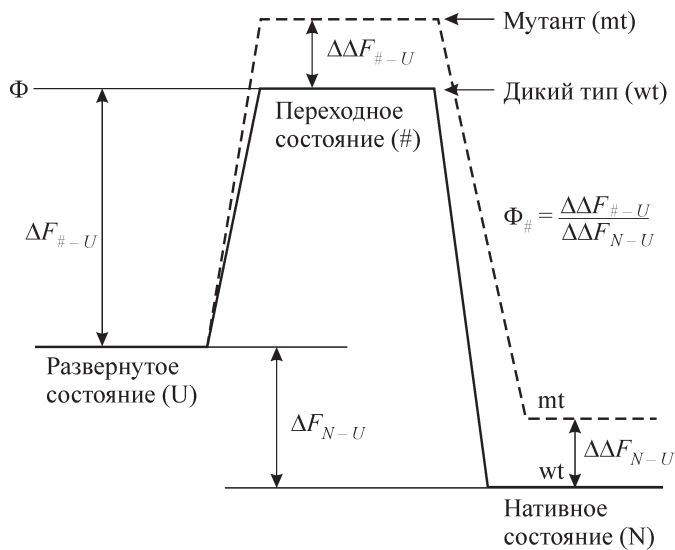


Рис. 3. Схема, иллюстрирующая взаимное расположение свободных энергетических уровней белка в нативном (N), переходном (#) и полностью развернутом (U) состояниях.

Регистрация равновесной зависимости любой экстенсивной физической характеристики белка от температуры или концентрации химического денатуранта позволяет определить разность свободных энергий макромолекулы белка в этих состояниях ΔF_{N-U} . Регистрация кинетики процесса сворачивания белка в нативное состояние позволяет определить величину свободноэнергетического барьера $\Delta F_{\#-U}$, разделяющего состояния N и U. Определение этих величин для белка с точечными аминокислотными заменами позволяет определить участие отдельных аминокислотных остатков в формировании переходного состояния.

bson, 2004; Zeeb, Balbach, 2004). Флуоресценция гидрофобного красителя АНС (1-анилинонафталин-8-сульфоната) используется для тестирования гидрофобных кластеров на поверхности белка и возникновения аморфных агрегатов (Uversky et al., 1996). Другой флуоресцентный краситель — тиофлавин Т — используется для тестирования амилоидных фибрилл, богатых β -складчатыми структурами. Свободный краситель в водном растворе имеет очень низкий квантовый выход флуоресценции. При встраивании в амилоидные фибриллы квантовый выход флуоресценции тиофлавина Т возрастает на три порядка (Le Vine, 1999; Воропай и др., 2003; Melanie, 2004).

Проведение исследований процессов сворачивания—разворачивания белков с использованием этих методов показало, что по крайней мере для сравнительно небольших однодоменных белков переход между развернутым (U) и нативным (N) состояниями является обратимым и осуществляется по принципу «все или ничего». Регистрация равновесной зависимости любой экстенсивной физической характеристики белка от температуры или концентрации химического денатуранта позволяет определить константу равновесия в каждой точке денатурационной зависимости:

$$K_{N-U}(\theta) = \frac{[U]}{[N]} = \frac{I_N - I(\theta)}{I(\theta) - I_U} \quad (1)$$

и тем самым разность свободных энергий макромолекулы белка в этих состояниях ΔF_{N-U} (рис. 3):

$$\Delta F_{N-U} = \Delta H_{N-U} - T\Delta S_{N-U} = -RT \ln K_{N-U}. \quad (2)$$

Здесь ΔH_{N-U} и ΔS_{N-U} — изменение соответственно энтальпии и энтропии в результате реакции $U \rightarrow N$, R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, $I(\theta)$ — экспериментально измеряемая величина, θ — температура или концентрация денатуранта, $I_N(\theta)$ и $I_U(\theta)$ — значения $I(\theta)$ для белка в нативном и денатурированном состояниях. Обычно принимается, что $I_N(\theta) = a_N + b_N \cdot \theta$ и $I_U(\theta) = a_U + b_U \cdot \theta$, где a_N, b_N, a_U, b_U — постоянные. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что свободная энергия макромолекулы белка в состояниях N и U различается не очень сильно, так что путем изменения температуры или концентрации химического денатуранта (гуанидингидрохлорида, мочевины, ионов H^+ или OH^- и т. п.) можно подобрать условия, при которых свободные энергии нативного и полностью развернутого состояний становятся равными. При этом нативная структура стабильна благодаря сильным взаимодействиям в макромолекуле белка (в том числе гидрофобным взаимодействиям, возникновение которых существенно увеличивает энтропию системы белок—растворитель), развернутая — за счет высокого уровня конформационной энтропии основной цепи.

Разность свободных энергий белка в нативном и развернутом состояниях ΔF_{N-U} является мерой стабильности белка. Стабильность белка изменяется линейно с изменением концентрации денатуранта (Nolting, 1999):

$$\Delta F([D]) = \Delta F([0]) - m \cdot [D], \quad (3)$$

где $[D]$ — концентрация денатуранта, $\Delta F([0])$ — разность свободных энергий макромолекулы белка в состояниях N и U в отсутствие денатуранта, $m = \partial(\Delta F_{N-U}([D])) / \partial([D])$. Зависимость стабильности белка от температуры подчиняется соотношению Гиббса—Гельмгольца (Privalov, Potekhin, 1986; Kuhlman, Raleigh, 1998; Nolting, 1999):

$$\Delta F(T) = \Delta H_m(1 - T/T_m) - \Delta C_p[(T_m - T) + T \ln [T/T_m]], \quad (4)$$

где T_m — температура середины перехода, $\Delta H_m, \Delta C_p$ — изменение величин энтальпии и теплоемкости при переходе из состояния U в N при температуре T_m .

Сопоставление результатов определения основных термодинамических характеристик процесса разворачивания белка, полученных путем измерения равновесных зависимостей тех или иных физических характеристик (метод Ван-Гоффа) и методом дифференциальной сканирующей калориметрии, позволяет делать вывод о кооперативности процесса разворачивания белка (Финкельштейн, Птицын, 2002).

Белки — это природные гетерополимеры, однако по свойствам они существенно отличаются от синтетических гетерополимеров. Большое разнообразие мономерных звеньев (20 различных аминокислот) само по себе уже существенно отличает белки от синтетических гетерополимеров. В отличие от синтетических полимеров число мономерных звеньев (аминокислот), образующих белок, и их последовательность в белковой цепи строго детерминированы. И наконец (и это очень существенно!), в отличие от синтетических полимеров белки могут образовывать кристаллы, т. е. все молекулы белка в нативном состоянии идентичны, если, конечно, не считать флуктуаций структуры, обусловленных тепловым броуновским движением входящих в их состав атомов. А это возможно только в том случае, если между нативным и

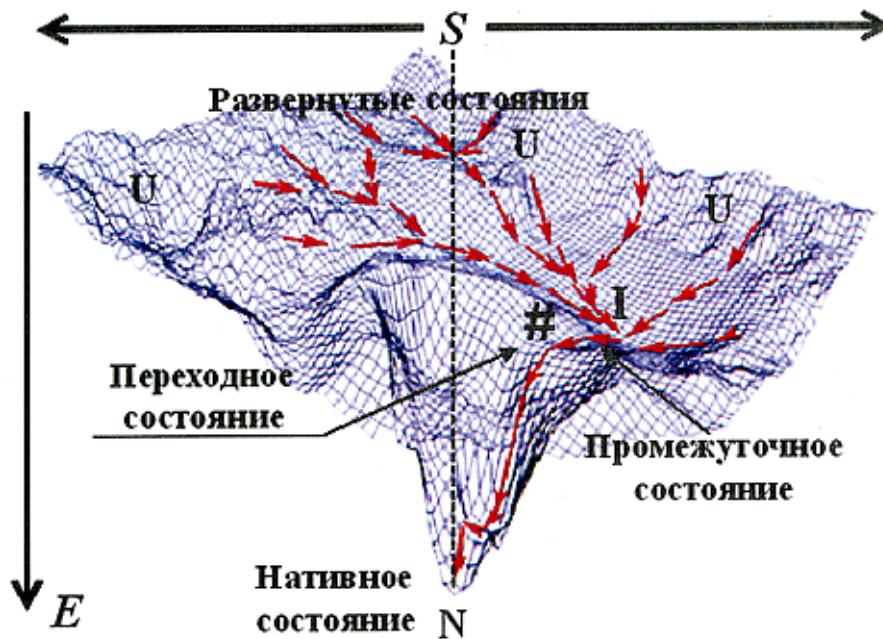


Рис. 4. Энергетическая поверхность, определяющая пути сворачивания белка в нативное состояние.

По современным представлениям, развернутому состоянию полипептидной цепи отвечает широкое «холмистое плато» свободной энергии, отражающее реализацию этого состояния огромным числом конформаций основной цепи. Переход от полностью развернутого состояния в нативное состояние, отвечающее глобальному минимуму свободной энергии, может осуществляться различными путями. Наряду с глобальным минимумом свободной энергии возможно существование локальных минимумов свободной энергии, отвечающих существованию частично-свернутых промежуточных состояний белка. Число возможных конформационных состояний полипептидной цепи уменьшается по мере приближения к нативному состоянию, поэтому такую энергетическую поверхность часто называют также «энергетической воронкой». Переход из развернутого в нативное состояние требует преодоления активационного барьера (переходное состояние), наличие которого обуславливает кооперативность процессов сворачивания—разворачивания белка.

всеми другими состояниями белка (полностью развернутым состоянием или промежуточным частично свернутым состоянием) существует свободноэнергетический барьер. Таким образом, в отличие от синтетических полимеров первичная структура белка такова, что она обеспечивает существование энергетического барьера между нативным и развернутым (или промежуточным) состояниями. В результате этот переход является фазовым переходом первого рода и осуществляется по принципу «все или ничего». Это обстоятельство чрезвычайно существенно для правильного функционирования белков, так как только существование свободноэнергетического барьера между нативным и денатурированными состояниями белка приводит к тому, что все молекулы белка в нативном состоянии идентичны. Уникальная первичная структура, обеспечивающая существование энергетического барьера между нативным и денатурированными состояниями, является результатом эволюционного отбора.

Величину свободноэнергетического барьера $\Delta F_{\#-U}$, разделяющего состояния N и U (рис. 4), можно определить, измерив константу скорости процесса сворачивания белка k_{U-N} :

$$k_{U-N} = \left(\frac{k_B T}{h} \right) \exp \left(\frac{-\Delta F_{\#-U}}{RT} \right). \quad (5)$$

Здесь # — переходное состояние, k_B — постоянная Больцмана, h — постоянная Планка; остальные величины были определены выше. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что если процесс сворачивания

белка не осложнен процессами изомеризации пролиновых остатков, реорганизацией S—S-связей и т. п., то при физиологических условиях процесс сворачивания белка осуществляется быстро, за доли секунды. Это свидетельствует о том, что свободноэнергетический барьер на пути сворачивания белка невысок. Сворачивание белка, т. е. переход из развернутого состояния, которое может быть реализовано огромным числом конформаций боковой цепи, в нативное состояние, в котором конформация основной цепи строго детерминирована, связано с огромным увеличением свободной энергии за счет уменьшения конформационной энтропии основной цепи. Это означает, что процесс $U \rightarrow N$ может осуществляться быстро только в том случае, если потеря конформационной энтропии основной цепи компенсируется уменьшением свободной энергии за счет возникновения внутримолекулярных контактов.

Как уже было сказано выше, макромолекуле белка, в каком бы структурном состоянии она ни находилась (в том числе и нативном), присущ определенный уровень структурной (равновесной) динамики, обусловленный тепловым броуновским движением входящих в состав белка атомов (Kau, 2005; Lange et al., 2005; Smith et al., 2005). Существует представление о том, что внутримолекулярная подвижность играет важную роль при выполнении белком его функции. Предполагается, что за счет теплового броуновского движения часть макромолекул принимает конформацию, при которой выполнение биологической функции (например, взаимодействие фермента с субстратом, взаимодействие антиген—анти тело и т. д.) термодинамически более выгодно по сравнению с конформацией основного состояния макромолекулы.

Для объяснения одностадийного сворачивания белка было предложено несколько разных моделей, различающихся в деталях, но близких по своей сути. Предполагается, что в результате флуктуации основной цепи белковая цепь достигает такого состояния, в котором присутствует определенный набор нативных контактов между остатками — как соседними, так и достаточно удаленными друг от друга по цепи. После формирования ядра сворачивания процесс фолдинга быстро приходит к завершению. Ядром сворачивания может стать, например, участок α -спирали, образующийся на начальном этапе сворачивания белка, или образование нативных контактов между неполярными группами боковых цепей, приводящее в конечном итоге к образованию гидрофобного ядра молекулы. Как уже было сказано выше, образование контактов между неполярными группами белка сопровождается возрастанием энтропии растворителя, которая компенсирует уменьшение энтропии, связанное с уменьшением числа возможных конформаций основной цепи белка при его сворачивании в глобулу. Гидрофобные взаимодействия являются определяющими в формировании нативной глобулярной структуры макромолекулы белков.

Сворачивание белков через образование промежуточных состояний

Не все белки сворачиваются в нативное состояние по одностадийному механизму. В начале 1980-х годов было установлено, что переход из нативного состояния в полностью развернутое для ряда белков осуществляется не по принципу «все или ничего», а через образование термодинамически стабильных промежуточных состояний (Dolgikh et al., 1981; Гильманшин и др., 1982). Было также показано, что ренатурация многих глобулярных белков из полностью развернутого состояния происходит через стадию накопления кинетического интермедиата (Ptitsyn, 1995), свойства которого совпадают со свойствами термодинамически стабильного состояния белковой молекулы, промежуточного между нативным и полностью развернутым состояниями. В этом состоянии макромолекула белка сохраняет компактность и выраженную вторичную структуру, присущую нативному состоянию, однако отличается от нативной молекулы отсутствием жесткой упаковки боковых цепей. О. Б. Птицыным была выдвинута идея (см.: Ohgushi, Wada, 1983) о том, что это состояние белка, названное по совокупности перечисленных выше признаков «расплавленной глобулой», может играть универсальную роль в процессе самоорганизации белковой молекулы.

Идея о существовании универсального термодинамически стабильного интермедиата типа расплавленной глобулы оказалась исключительно плодотворной и на длительное время определила направление научных исследований многих ведущих лабораторий мира. Интерес исследователей к изучению белков в состоянии расплавленной глобулы еще более возрос в связи с появлением данных о том, что это состояние, возможно, является одной из основных форм существования макромолекул белков в клетке и обеспечивает ряд существенных внутривнутриклеточных процессов, таких как узнавание белков шаперонами, проникновение белков через мембраны, диссоциация лигандов и т. д. (см., например: Vychkova, Ptitsyn, 1993).

В последующем выяснилось, что наряду с состоянием типа расплавленной глобулы возможны и другие денатурированные частично свернутые состояния белка, например предшественник расплавленной глобулы (Uversky, 1993; Uversky, Ptitsyn, 1996) или высокоструктурированная расплавленная глобула (Dobson, 1992). Во многих случаях было обнаружено, что переход в промежуточное состояние сопровождается агрегацией или специфической ассоциацией (Fink, 1998), что совершенно исключалось в модели «расплавленной глобулы».

Модель энергетической воронки

Согласно современным представлениям, переход от полностью развернутого состояния в уникальное нативное состояние может осуществляться различными путями, которые определяются энергетической поверхностью, т. е. зависимостью свободной энергии макромолекулы белка от всех координат, определяющих состояние системы (модель «энергетических поверхностей»; Dinner et al., 2000). В рамках этой модели развернутому состоянию полипептидной цепи отвечает широкое «холмистое плато» свободной энергии, отражающее реализацию этого состояния огромным числом конформаций основной цепи. Возвышенности на плато отражают существование запрещенных конформаций (рис. 4). Переход от полностью развернутого состояния в уникальное нативное состояние может осуществляться различными путями. Число возможных конформационных состояний полипептидной цепи уменьшается по мере приближения к нативному состоянию, поэтому такую энергетическую поверхность часто называют также «энергетической воронкой». Совпадение денатурационных кривых, полученных путем измерения различных физических характеристик белка, является экспериментальным свидетельством того, что переход между этими состояниями осуществляется по принципу «все или ничего». Это означает, что плато отделено от входа в воронку свободноэнергетическим барьером, отвечающим переходному состоянию #.

Переходное состояние и ядро сворачивания

Изучение переходного состояния — ключевой момент в изучении процесса фолдинга. Величина барьера между нативным и денатурированным состояниями может быть определена из экспериментов по изучению кинетики сворачивания.

Для того чтобы определить структуру переходного состояния, т. е. выявить те аминокислотные остатки, взаимодействие между которыми происходит на ранних стадиях сворачивания белка, А. Фершт предложил использовать изучение кинетики сворачивания различных мутантных форм белка (см., например: Matouschek et al., 1989, 1990; Fersht, 1998). Точечная мутация в белке может приводить к изменению стабильности нативного белка и скорости сворачивания. Различие стабильности нативного состояния белка дикого типа и мутанта $\Delta\Delta F_{N-U}$ может быть определено на основании измерения денатурационных кривых этих двух белков. Путем измерения констант скоростей образования нативного состояния белка дикого типа и мутанта может быть определена

разность свободных энергий этих белков в переходном состоянии $\Delta\Delta F_{\#-U}$ (рис. 3). Величина отношения $\Phi_{\#} = \Delta\Delta F_{\#-U} / \Delta\Delta F_{N-U}$ является мерой участия этого остатка в формировании структуры переходного состояния. Величина $\Phi_{\#}$ равна единице в том случае, если контакты этой аминокислоты, определяющие изменение стабильности белка в нативном состоянии, возникли уже в переходном состоянии. Это говорит о том, что данная аминокислота входит в ядро сворачивания. Другой крайний случай — величина $\Phi_{\#}$ равна нулю. Это свидетельствует о том, что контакты данной аминокислоты, влияющие на стабильность нативного белка, возникают на последнем этапе сворачивания после преодоления молекулой свободноэнергетического барьера, отвечающего переходному состоянию.

Развернутое состояние белка

Структура белков в развернутом состоянии вряд ли даже отдаленно напоминает структуру статистического клубка, характерного для линейных полимеров в «хорошем» растворителе. Белок приобретает структуру, близкую к структуре статистического клубка, лишь в растворах с высоким содержанием денатурантов, таких как мочевины или гуанидингидрохлорид. Имеются, однако, данные о том, что даже при высоких концентрациях мочевины (8 M) макромолекулы некоторых белков сохраняют элементы структуры, присущие нативному состоянию (Shortle, Ackerman, 2001). Таким образом, состояние U достаточно компактно, и число конформаций основной цепи, с помощью которых оно может быть реализовано, значительно меньше числа всех возможных конформаций основной цепи.

Нативное состояние — отвечает ли оно глобальному минимуму свободной энергии?

В том случае, если на склонах воронки нет глубоких минимумов, молекула после преодоления свободноэнергетического барьера быстро достигает нативного состояния. Скорее всего, минимум свободной энергии, отвечающей нативному состоянию, в которое белок сворачивается наиболее быстро, является одновременно и абсолютным минимумом свободной энергии. Модель энергетической воронки позволяет, однако, предположить, что нативное состояние не обязательно отвечает абсолютному минимуму свободной энергии, а является состоянием, отвечающим минимуму свободной энергии, который достигается скорейшим образом. Возможно, существует еще один более глубокий или близкий по величине свободной энергии минимум, отделенный от нативного состояния свободноэнергетическим барьером. В этом случае молекула быстро сворачивается в нативное состояние, а потом медленно переходит в неправильно свернутое состояние, отвечающее этому более глубокому, или глобальному, минимуму. Скорость перехода в это неправильно свернутое состояние зависит от свободноэнергетического барьера, отделяющего его от нативного состояния. Примерами белков, для которых такая ситуация реализуется, являются ингибиторы сериновых протеаз — серпины.

Энергетические поверхности сворачивания прионов, по-видимому, также имеют два близких по величине ми-

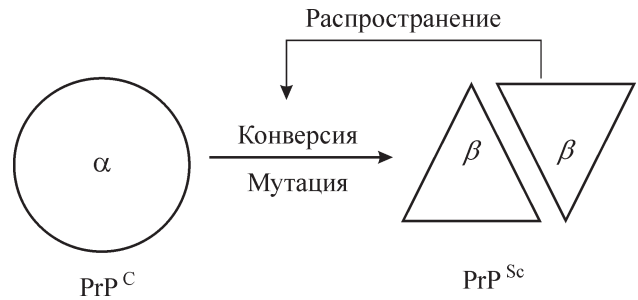


Рис. 5. Схема, иллюстрирующая переход прионного белка, имеющего преимущественно α -спиральную структуру, в состояние амилоидных фибрилл.

В нативном состоянии прионы являются мономерными белками с выраженной α -спиральной вторичной структурой. Второму минимуму свободной энергии отвечает состояние с β -складчатой вторичной структурой. Белок в этом состоянии склонен к агрегации с образованием амилоидных фибрилл. В обычных условиях такие неправильно свернутые молекулы белка ликвидируются защитными системами клетки. Привнесенный извне прионный белок с β -складчатой вторичной структурой может стать зародышем агрегации, делающей процесс превращения α -формы белка в β -форму необратимым. Это и становится причиной развития инфекционной губчатой энцефалопатии — болезни «коровьего бешенства» (по: Zahn, 1999, с модификациями).

В нативном состоянии прионы являются белками с выраженной α -спиральной вторичной структурой. Второму минимуму свободной энергии отвечает состояние с β -складчатой вторичной структурой. Белок в этом состоянии склонен к агрегации с образованием амилоидных фибрилл. В обычных условиях такие неправильно свернутые молекулы белка ликвидируются защитными системами клетки. Привнесение этого белка извне инициирует процесс превращения α -формы белка в β -форму (рис. 5), что становится причиной развития инфекционной губчатой энцефалопатии — болезни «коровьего бешенства» (Zahn, 1999). Существует ряд других тяжелых заболеваний (которые иногда называют конформационными болезнями), таких как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и т. д., также связанных с нарушением правильного фолдинга белков и возникновением амилоидных фибрилл (Harper, Lansbury, 1997; Carrell, Gooptu, 1998; Fink, 1998; Uversky et al., 1999). Болезни эти наиболее часто встречаются у людей преклонного возраста, когда защитные системы клеток и организма в целом не справляются с функцией ликвидации неправильно свернутых белков.

Роль промежуточных состояний в образовании агрегированных форм белков

При наличии на склонах воронки глубоких локальных минимумов могут образовываться промежуточные состояния. Соотношение доли молекул, находящихся в нативном и промежуточном состояниях в условиях равновесия, определяется разностью их свободных энергий, скорость достижения равновесия — величиной свободноэнергетического барьера, отделяющего эти состояния.

В противоположность представлению о том, что промежуточное состояние, являясь вехой на пути сворачивания, может содержать только нативоподобные структуры, модель энергетической поверхности позволяет предположить, что могут существовать промежуточные состояния, имеющие элементы структуры, не

присутствующие в нативном белке. Возникновение таких промежуточных состояний может инициировать ассоциацию или агрегацию макромолекул. В некоторых случаях эти агрегаты могут иметь аморфный характер, в других — возникают обогащенные β -структурой амилоидные фибриллы. Исследования структуры и путей образования денатурированных частично свернутых агрегированных (ассоциированных) форм белков важны не только для решения фундаментальной проблемы фолдинга белка, но имеют также существенное практическое значение для медицины (выяснение причин заболеваний, связанных с нарушением фолдинга белков: Harper, Lansbury, 1997; Carrell, Gooptu, 1998; Fink, 1998; Uversky et al., 1999; Selkoe, 2003) и биотехнологии (анализ причин возникновения неправильно свернутых агрегированных форм рекомбинантных белков и их аккумуляция в телах включения: Wetzel, 1994; Speed et al., 1996; Fink, 1998).

В связи с практической значимостью для медицины выяснение факторов, способствующих образованию амилоидных фибрилл, а также изучение структуры белков в этом состоянии являются в настоящее время предметом интенсивных исследований. Установлено, что амилоидные фибриллы разного происхождения имеют сходную морфологию. Они представляют собой длинные неразветвленные структуры диаметром несколько нанометров, образованные перевитыми между собой протофибриллами, в которых β -слои ориентированы перпендикулярно оси фибриллы (Dobson, 2003; Dumoulin, Dobson, 2004). Для все большего числа белков удается подобрать условия, при которых такие структуры возникают (Goers et al., 2002). Обычно амилоидные фибриллы образуются при инкубации белков, находящихся в промежуточных состояниях, при повышенной температуре и интенсивном перемешивании. Это обусловлено, по-видимому, тем, что для этих белков рядом с минимумом свободной энергии, отвечающим промежуточному состоянию, имеется еще один, достаточно глубокий минимум свободной энергии, отвечающий β -форме белка. В этом состоянии белки склонны к агрегации с образованием амилоидных фибрилл. Переход из промежуточного состояния в β -форму при низкой температуре происходит очень медленно, поскольку он требует преодоления значительного активационного барьера, разделяющего эти состояния белка. Скорость этого процесса существенно возрастает при инкубации белка при повышенной температуре. Ввиду того что процесс агрегации β -формы белка сопровождается значительным снижением свободной энергии и является необратимым, этот процесс может осуществляться даже в том случае, если мономер белка в β -форме имеет более высокий уровень свободной энергии, чем тот же белок в промежуточном состоянии, из которого эта форма возникает.

Таким образом, экспериментальные результаты, полученные *in vitro*, свидетельствуют о том, что первичная структура несет информацию о пространственной структуре макромолекулы и путях ее достижения. Кроме того, она обеспечивает существование свободноэнергетического барьера между развернутым и нативным состояниями белка, в результате чего переход U—N осуществляется как фазовый переход первого рода. Несмотря на огромное число экспериментальных и теоретических работ по изучению процессов сворачивания—разворачивания белков, вопрос о том, каким образом в последовательности аминокислотных остатков закодирована инфор-

мация о пространственной структуре белка, остается нерешенным.

В настоящее время ключевым вопросом является выяснение структуры ядра сворачивания, что требует выполнения чрезвычайно трудоемких экспериментов с привлечением методов геной инженерии для получения мутантных форм белка и физико-химического исследования кинетики процессов их сворачивания—разворачивания. Большинство работ выполнено на небольших однодоменных белках. Значительно менее исследованы процессы фолдинга мультидоменных глобулярных и водонерастворимых мембранных белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 04-04-49622 и 04-04-49290), программы президиума РАН «Молекулярная клеточная биология» и INTAS (грант 01-2347).

Список литературы

- Воропай Е. С., Самцов М. П., Каплевский К. Н., Маскевич А. А., Степура В. И., Поварова О. И., Кузнецова И. М., Туроверов К. К., Финк А. Л., Уверский В. Н. 2003. Спектральные свойства тиофлавина Т и его комплексов с амилоидными фибриллами. Журн. прикл. спектроскопии. 70 (6) : 767—773.
- Гильманшин Р. И., Долгих Д. А., Птицын О. Б., Финкельштейн А. В., Шахнович Е. И. 1982. Белковые глобулы без уникальной пространственной структуры: экспериментальные данные для α -лактальбуминов и общая модель. Биофизика. 27 (6) : 1005—1016.
- Финкельштейн А. В., Птицын О. Б. 2002. Физика белка. М: Книжный дом «Университет». 376 с.
- Anfinsen C. B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. Science. 181 : 223—230.
- Arai M., Inobe T., Maki K., Ikura T., Kihara H., Amemiya Y., Kuwajima K. 2003. Denaturation and reassembly of chaperon in GroEL studied by solution X-ray scattering. Protein Sci. 12 : 672—680.
- Bader M. V., Bardwell J. C. A. 2002. Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in *Escherichia coli*. Adv. Protein Chem. 59 : 283—301.
- Baldwin R. L., Rose G. D. 1999. Is protein folding hierarchic? Trends Biochem. Sci. 24 : 26—33; 77—83.
- Bychkova V. E., Ptitsyn O. B. 1993. The molten globule *in vitro* and *in vivo*. Chemtracts — Biochem. Mol. Biol. 4 : 133—163.
- Carrell R. W., Gooptu B. 1998. Conformational changes and disease — serpins, prions and Alzheimer's. Curr. Opin. Struct. Biol. 8 : 799—809.
- Chen J., Walter S., Horwich A. L., Smith D. L. 2001. Folding of malate dehydrogenase inside the GroEL-GroES cavity. Nature Struct. Biol. 8 : 721—728.
- Csermely P., Schnaider T., Soti C., Pronászka Z., Nardai G. 1998. The 90-kDa molecular chaperone family. Structure, function, and clinical applications. Pharmacology and Therapeutics. 79 : 129—168.
- Dinner A. R., Sali A., Smith L. J., Dobson C. M., Karplus M. 2000. Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. Trends Biochem. Sci. 25 : 331—339.
- Dobson C. M. 1992. Unfolded proteins, compact states and molten globules. Curr. Opin. Struct. Biol. 2 : 6—12.
- Dobson C. M. 2003. Protein folding and misfolding. Nature. 421 : 884—890.
- Dobson C. M. 2004. Experimental investigation of protein folding and misfolding. Methods. 34 : 4—14.
- Dolgikh D. A., Gilmanshin R. I., Brazhnikov E. V., Bychkova V. E., Semisotnov G. V., Venyaminov S. Y., Ptitsyn O. B. 1981.

α -Lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure? FEBS Lett. 136 : 311—315.

Dumoulin M., Dobson C. M. 2004. Probing the origins, diagnosis and treatment of amyloid diseases using antibodies. Biochimie. 86 : 589—600.

Eaton W. A., Munoz V., Hagen S. J., Jas G. S., Lapidus L. J., Henry E. R., Hofrichter J. 2000. Fast kinetics and mechanisms in protein folding. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 29 : 327—359.

Ellis R. J., Hartl F. U. 1999. Principles of protein folding in the cellular environment. Curr. Opin. Struct. Biol. 9 : 102—110.

Fersht A. 1998. Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. New York: W. H. Freeman and Comp. 631 p.

Fink A. L. 1998. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. Fold Des. 3 : R9—R23.

Gilbert H. F. 1994. Protein chaperones and protein folding. Cur. Opin. Struct. Biol. 5 : 534—539.

Goers J., Permyakov S. E., Permyakov E. A., Uversky V. N., Fink A. L. 2002. Conformational prerequisites for alpha-lactalbumin fibrillation. Biochemistry. 41 : 12 546—12 551.

Goldbeck R. A., Kim-Shapiro D. B., Kliger D. S. 1997. Fast natural and magnetic circular dichroism spectroscopy. Annu. Rev. Phys. Chem. 48 : 453—479.

Harper J. D., Lansbury P. T., Jr. 1997. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. Annu. Rev. Biochem. 66 : 385—407.

Hartl F. U., Martin J. 1995. Molecular chaperones in cellular protein folding. Curr. Opin. Struct. Biol. 5 : 92—102.

Kay L. E. 2005. NMR studies of protein structure and dynamics. J. Magn. Reson. 173 : 193—207.

Kuhlman B., Raleigh D. P. 1998. Global analysis of the thermal and chemical denaturation of the N-terminal domain of the ribosomal protein L9 in H₂O and D₂O. Determination of the thermodynamic parameters, ΔH^0 , ΔS^0 , and ΔC^0 and evaluation of solvent isotope effects. Protein Sci. 7 : 2405—2412.

Kuznetsova I. M., Stepanenko Olga V., Stepanenko Olesia V., Povarova O. I., Biktashev A. G., Verkhusha V. V., Shavlovskiy M. M., Turoverov K. K. 2002. The place of inactivated actin and its kinetic predecessor in actin folding—unfolding. Biochemistry. 41 : 13 127—13 132.

Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Uversky V. N. 2004. Use of phase diagram method to analyze the protein unfolding—refolding reactions: fishing out the «invisible» intermediates. J. Proteome Res. 3 : 485—494.

Lange O. F., Grubmuller H., de Groot B. L. 2005. Molecular dynamics simulations of protein G challenge NMR-derived correlated backbone motions. Angew. Chem. 44 : 3394—3399.

LeVine H. III. 1999. Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. Meth. Enzymol. 309 : 274—284.

Levinthal C. 1968. Are there pathways for protein folding? J. Chem. Phys. 65 : 44—45.

Matouschek A., Kellis J. T., Jr., Serrano L., Bycroft M., Fersht A. R. 1990. Transient folding intermediates characterized by protein engineering. Nature. 346 : 440—445.

Matouschek A., Kellis J. T., Jr., Serrano L., Fersht A. R. 1989. Mapping the transition state and pathway of protein folding by protein engineering. Nature. 340 : 122—126.

Melanie R. N. 2004. Techniques to study amyloid fibril formation *in vitro*. Methods. 34 : 151—160.

Netzer W. J., Hartl F. U. 1998. Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. Trends Biochem. Sci. 23 : 68—73.

Nolting B. 1999. Protein folding kinetics. Biophys. Methods. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag. 145 p.

Ohgushi M., Wada A. 1983. «Molten-globule state»: a compact form of globular proteins with mobile side-chains. FEBS Lett. 164 : 21—24.

Plotkin S. S., Onuchic J. N. 2002. Understanding protein folding with energy landscape theory. I. Basic concepts. Quart. Rev. Biophys. 35 : 111—167.

Pollack L., Tate M. W., Darnton N. C., Knight J. B., Gruner S. M., Eaton W. A., Austin R. H. 1999. Compactness of the denatured state of a fast-folding protein measured by submillisecond small-angle X-ray scattering. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 96 : 10 115—10 117.

Privalov P. L., Potekhin S. A. 1986. Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. Meth. Enzymol. 131 : 4—51.

Ptitsyn O. B. 1995. Molten globule and protein folding. Adv. Protein Chem. 47 : 83—229.

Radford S. 2000. Protein folding: progress made and promises ahead. Trends Biochem. Sci. 25 : 611—618.

Roder H., Shastry M. C. R. 1999. Methods for exploring early events in protein folding. Curr. Opin. Struct. Biol. 9 : 620—626.

Schmid F. X. 2002. Prolyl isomerases. Adv. Protein Chem. 59 : 243—282.

Selkoe D. J. 2003. Folding proteins in fatal ways. Nature. 426 : 900—904.

Shortle D., Ackerman M. S. 2001. Persistence of native-like topology in a denatured protein in 8 M urea. Science. 293 : 487—489.

Smith G. R., Sternberg M. J., Bates P. A. 2005. The relationship between the flexibility of proteins and their conformational states on forming protein—protein complexes with an application to protein—protein docking. J. Mol. Biol. 347 : 1077—1101.

Speed M. A., Wang D. I., King J. 1996. Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition. Nat. Biotechnol. 14 : 1283—1287.

Uversky V. N. 1993. Use of fast-protein size-exclusion chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule. Biochemistry. 32 : 13 288—13 298.

Uversky V. N., Ptitsyn O. B. 1996. Further evidence on the equilibrium «pre-molten globule state»: four-state GdmCl-induced unfolding of carbonic anhydrase B at low temperature. J. Mol. Biol. 255 : 215—228.

Uversky V. N., Talapatra A., Gillespie J. R., Fink A. L. 1999. Protein deposits as the molecular basis of amyloidosis. Med. Sci. Monitor. 5 : 1001—1012; 1238—1254.

Uversky V. N., Winter S., Lober G. 1996. Use of fluorescence decay times of 8-ANS-protein complexes to study the conformational transition in proteins which unfold through the molten globule state. Biophys. Chem. 60 : 79—88.

Wetzel R. 1994. Mutations and off-pathway aggregation of proteins. Trends Biotechnol. 12 : 193—198.

Zahn R. 1999. Prion propagation and molecular chaperones. Quart. Rev. Biophys. 32 : 309—370.

Zeeb M., Balbach J. 2004. Protein folding studied by real-time NMR spectroscopy. Methods. 34 : 65—74.

Поступила 10 V 2005

STRUCTURAL DYNAMICS, STABILITY AND FOLDING OF PROTEINS

I. M. Kuznetsova,¹ V. Forge,² K. K. Turoverov¹

¹ Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg, Russia, and ² Department of Molecular and Structural Biology of the Commissariat of Atomic Energy, Grenoble, France;
¹ e-mail: kkt@mail.cytspb.rssi.ru

The present concepts of protein folding *in vitro* are reviewed. According to these concepts, amino acid sequence of protein, which has appeared a result of evolutionary selection, determines the native structure of protein, the pathway of protein folding, and the existence of free energy barrier between native and denatured states of protein. The latter means that protein macromolecule can exist in either native or denatured state. And all macromolecules in the native state are identical but for structural fluctuations due to Brownian motion of their atoms. Identity of all molecules in native state is of primary importance for their correct functioning. The dependence of protein stability, which is measured as the difference between free energy of protein in native and denatured states, on temperature and denaturant concentration is discussed. The modern approaches characterizing transition state and nucleation are regarded. The role of intermediate and misfolded states in amorphous aggregate and amyloid fibril formation is discussed.

Key words: protein folding, equilibrium protein dynamics, intermediate states, transition state, folding nucleus, amyloid fibril, protein stability.
