

## УЗЛЫ В СТРУКТУРЕ БЕЛКОВ

© Олесь В. Степаненко,<sup>1,\*</sup> Г. С. Бубликов,<sup>1</sup> Ольга В. Степаненко,<sup>1</sup> Г. Н. Рычков,<sup>2,3</sup>  
О. И. Поварова,<sup>1</sup> В. В. Верхуша,<sup>4</sup> К. К. Туроверов,<sup>1,3</sup> И. М. Кузнецова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

<sup>2</sup> Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова  
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина,

<sup>3</sup> С.-Петербургский государственный политехнический университет  
и <sup>4</sup> Медицинский колледж им. А. Эйнштейна, Нью-Йорк, США;

\* электронный адрес: lvs@incras.ru

Долгое время образование полипептидной цепью белка узлов отрицалось. В настоящее время существование белков с узлами является установленным фактом. Функциональное назначение узлов в структуре белков остается неясным, несмотря на многочисленные предположения. Исследования структуры узелковых элементов различных белков и их влияния на процесс образования нативной конформации белка несомненно представляет большой интерес для понимания фолдинга белков в целом. В настоящем обзоре описаны основные типы узелковых элементов в структуре различных белков, в том числе трилистный узел, узел типа восьмерки и более сложные узелковые элементы с пятью пересечениями и более, а также особенности фолдинга белков с узелковой структурой.

Ключевые слова: узлы, фолдинг белков, трилистный узел, узел типа «восьмерка», сложные узлы с пятью пересечениями и более.

Долгое время считали, что существование узлов в структуре белков невозможно (Mansfield, 1994). Современные представления о фолдинге белков реализованы в модели энергетической воронки (Onuchic, Wolynes, 2004; Turoverov et al., 2010).

Считается, что в процессе эволюции преимущество получают те белковые последовательности, которым соответствует наиболее гладкая энергетическая поверхность с минимальным количеством энергетических ловушек, что приводит к кооперативному и быстрому сворачиванию полипептидной цепи (Watters et al., 2007).

В свою очередь образование узла полипептидной цепью сопряжено с высоким энтропийным барьером, что, безусловно, существенно замедляет фолдинг белка. В таком случае непонятно, почему природа в ходе эволюции должна сохранять белки, содержащие подобный структурный элемент. Впервые предположение о возможности образования полипептидной цепью узла было высказано почти 40 лет назад (Stirren, 1974), тем не менее долгое время эта гипотеза казалась абсурдной. Возможность образования узлов в структуре белка даже не рассматривалась при анализе рентгеноструктурных данных (Bryant et al., 1974) и при моделировании фолдинга белков.

В настоящее время многочисленные рентгеноструктурные данные неоспоримо свидетельствуют о существовании белков с узлами различного типа (Lai et al., 2007; Taylor, 2007; Viana et al., 2011).

## Типы узлов в структуре различных белков

Узлы обычно классифицируют по числу самопересечений. Первый обнаруженный в белках узел относился к типу трилистного узла (рис. 1, а). Этот простейший нетривиальный узел с тремя самопересечениями был найден в карбоангидразе — ферменте, катализирующем обратимую реакцию гидратации двуокиси углерода (Richardson, 1977). Удаление участка из 2—3 аминокислот с С-конца в карбоангидразе приводит к исчезновению узла, поэтому этот белок часто не классифицируют как белок, содержащий узел. К белкам, имеющим в своей структуре трилистный узел, относятся S-аденозилметионинсинтаза (Takusagawa et al., 1996a, 1996b), представители класса РНК-метилтрансфераз (Michel et al., 2002; Nureki et al., 2002), белок Rds3p с мотивом цинкового пальца из *Saccharomyces cerevisiae* (Van Roon et al., 2008) и белок из РНН-семейства ДНК-связывающих белков (Andreeva, Murzin, 2010; Bolinger et al., 2010).

Узел, принадлежащий к типу «восьмерка» (figure-of-eight) с четырьмя пересечениями полипептидной цепи, можно наблюдать в редуктоизомеразе кетоновых кислот, выделенной из растений (Leung, Guddat, 2009). Данный узелковый элемент в редуктоизомеразе является внутренним и обладает чрезвычайной стабильностью, он не разрушается даже при отщеплении 60 аминокислотных остатков с С-конца белка и более 300 аминокислотных остатков с N-концевого участка (Taylor, 2000). Узел типа «восьмерка» обнаружен также в хромофор-

связывающих доменах (CBD — chromophore-binding domains) бактериальных фитохромов (рис. 1, б). Существенный интерес к изучению бактериальных фитохромов связан с разработкой ближне-инфракрасных маркеров для получения прижизненных изображений тканей и органов животных (Piatkevich et al., 2013). Фитохромы относятся к классу фоторецепторов, которые присутствуют в растениях (Butler et al., 1959), грибах (Wu et al., 1997; Blumenstein et al., 2005; Froehlich et al., 2005; Brandt et al., 2008; De Riso et al., 2009) и прокариотах (Hughes et al., 1997; Montgomery, Lagarias, 2002). Фотореакции запускаются поглощением света хромофором и передаются на эффекторный домен, который запускает сигнальный кас-

кад. В бактериальных фитохромах хромофором является биливердин IXa (BV) (Rockwell, Lagarias, 2010), а эффекторный домен в большинстве случаев является гистидиновой киназой (Auldrige, Forest, 2011).

Бактериальные фитохромы могут существовать в двух состояниях, поглощающих в областях 680—710 (Pr-состояние) и 740—760 (Pfr-состояние) нм. У большинства бактериальных фитохромов основным является Pr-состояние, и лишь у небольшого числа фитохромов — Pfr-состояние (Rottwinkel et al., 2010). Бактериальные фитохромы в Pr- и в Pfr-состоянии различаются конформацией хромофора (образованного четырьмя пирольными кольцами A—D), D-кольцо BV находится в цис- и транс-конфигурации соответственно. Переходы между состояниями Pr ↔ Pfr происходят под действием облучения светом определенной длины волны. Кроме того, обратный переход из Pfr- в Pr-форму (или наоборот) может осуществляться медленно путем тепловой релаксации (Rockwell, Lagarias, 2010; Auldrige, Forest, 2011). Связывание BV происходит в связывающем домене CBD, который в бактериальных фитохромах представлен PAS- и GAF-доменами. Название доменов PAS и GAF является акронимом названий белков, в которых впервые были идентифицированы эти домены: PER/ARNT/Sim в случае PAS-домена и cGMP phosphodiesterase/Adenyl cyclase/FhlA в случае домена GAF. Домен PAS бактериальных фитохромов содержит в N-концевом участке консервативный цистеиновый остаток, через который происходит ковалентное присоединение хромофора, при этом сам хромофор встраивается в щель GAF-домена. N-концевой участок из 35 остатков PAS- и участок полипептидной цепи из GAF-домена (остатки 225—257) образуют узел, который локализован между PAS- и GAF-доменами. Первоначально структура узла была ошибочно классифицирована как трилистный узел, в котором полипептидная цепь имеет три пересечения (Wagner et al., 2005), но рентгеноструктурные данные CBD фитохрома из *Deinococcus radiodurans* (Dr-CBD), полученные с большим разрешением, позволили отнести этот узел к типу «восьмерка» с четырьмя пересечениями полипептидной цепи (Wagner et al., 2007).

Наиболее сложные узлы обнаружены в убиквитин-гидролазах (с пятью пересечениями полипептидной цепи (Lua, Grosberg, 2006; Virnau et al., 2006)) и в дегалогеназе DehI из *Pseudomonas putida* (с шестью пересечениями полипептидной цепи (Schmidberger et al., 2008; Bolinger

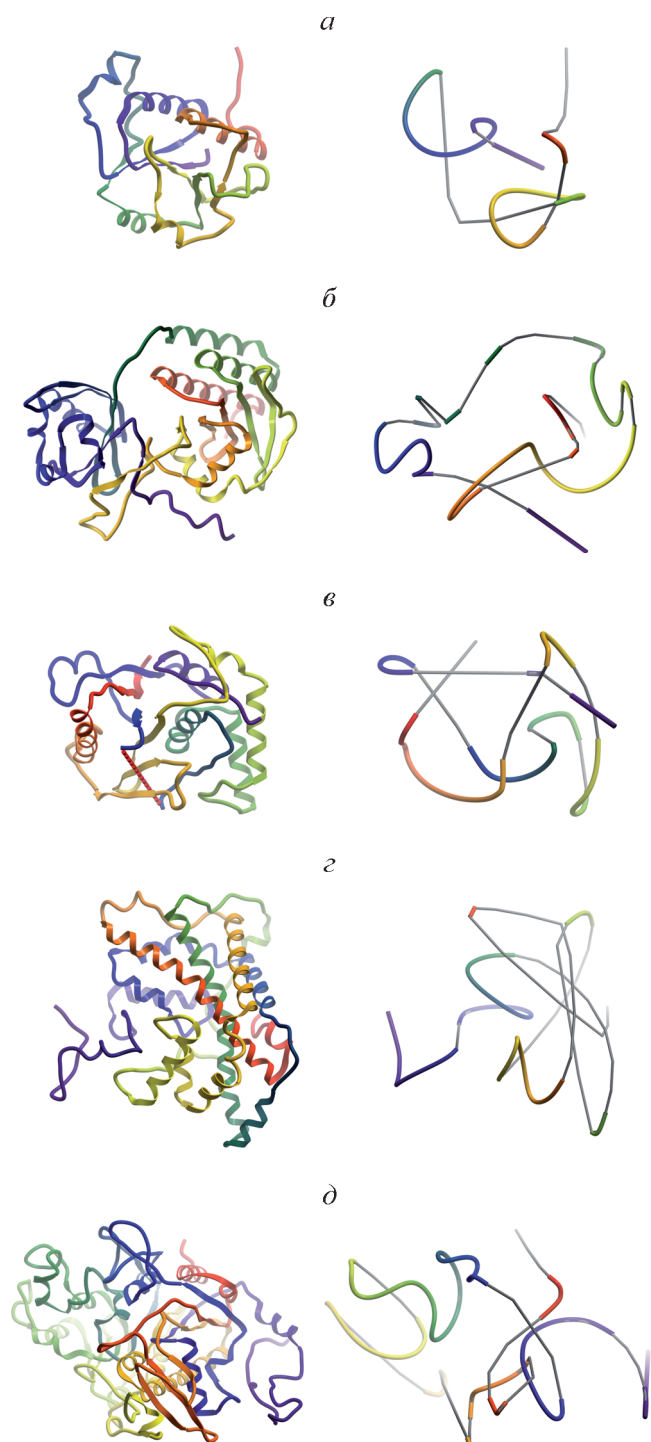


Рис. 1. Типы узлов в структуре различных белков. Пространственная структура белка (слева) и ее упрощенное представление, иллюстрирующее строение узла (справа).

a — трилистный узел в РНК-метилтрансферазе YibK из PDB: код 1mxi (Lim et al., 2003); б — узел типа «восьмерка» в CBD-доме бактериального фитохрома RpVphP2 из *Rhodospseudomonas palustris* (PDB: код 4e04 (Bellini, Papiz, 2012)); в — узел с пятью пересечениями полипептидной цепи в убиквитингидролазе Yuh1 дрожжей (PDB: код 1cmx (Johnston et al., 1999)); д — узел с шестью пересечениями полипептидной цепи в дегалогеназе DehI из *Pseudomonas putida* (PDB: код 3bjx (Schmidberger et al., 2008)); з — скользящий узел в щелочной фосфатазе из *Escherichia coli* (PDB: код 1alk (Kim, Wysocki, 1991)). Структуры белков окрашены согласно цветовой схеме, в которой осуществляется градиентный переход от синего цвета на N-конце к красному цвету на C-конце белка через промежуточные цвета в центре полипептидной цепи. Изображение, иллюстрирующее строение узла, окрашено по аналогичной цветовой схеме. В кристаллической структуре убиквитингидролазы (в) отсутствуют данные о пространственном расположении аминокислотных остатков в участке от 63-го по 77-й остаток, поэтому этот участок цепи замкнут отрезком красного цвета. Рисунок построен на основе базы данных PDB (Dutta et al., 2009). При подготовке рисунка использована программа ICM Pro (Abagyan et al., 1994).

et al., 2010)). Полипептидная цепь убиквитингидролаз, состоящих из 230 аминокислотных остатков, формирует узел в виде кренделя (рис. 1, в). Этот узел может быть распутан при отщеплении порядка 10 аминокислотных остатков с N-конца белка. Узел с 6-ю пересечениями в дегалогеназе DehI более стабилен, для его разрушения необходимо отщепление по крайней мере 20 аминокислотных остатков с C-конца и 65 остатков с N-конца белка (рис. 1, г). Узелковая структура в мономерном белке DehI образована обогащенной пролинами петлей, формирующей арку между двумя структурно одинаковыми участками из 130 аминокислотных остатков.

Ряд белков содержит так называемые скользящие узлы (рис. 1, д). В этом случае какая-то часть полипептидной цепи образует узел, но потом ход полипептидной цепи происходит в обратном направлении таким образом, что узел распутывается и полноразмерный белок не содержит узла. Простейшим примером скользящего узла может служить узел, которым мы зашнуровываем ботинки. Скользящие узлы обнаружены в щелочных фосфатазах и синтазах, в нескольких семействах трансмембранных транспортных белков прокариот, в бактериоцинах, тимидинкиназах герпес-вируса, нуклеотидпирофосфатазах, АДФ-рибозилтрансферазе кролика и в других белках (King et al., 2007; Sulkowska et al., 2012b).

Для обнаружения в белках скользящих узлов оказался полезным подход, основанный на построении матриц или так называемых отпечатков узлов (Taylor, 2005; King et al., 2007). В этих матрицах координаты каждой точки обозначают первую и последнюю аминокислоты (x и y соответственно) анализируемой укороченной полипептидной цепи данного белка. Если данная укороченная цепь образует узел, то точка матрицы окрашена (каждый вид узла имеет определенную цветовую кодировку), если укороченная цепь узла не образует, то точка остается неокрашенной. Точка в нижнем левом углу матрицы представляет собой полноразмерный белок. Таким образом, анализируется все множество укороченных цепей белка. Для белков, содержащих узел, нижний левый угол будет окрашен, в то время как для белков, содержащих скользящий узел, окрашенный участок будет смещен вправо, вверх либо относительно обоих направлений.

Построение таких матриц для целого ряда белков позволило отметить высокую консервативность этих матриц для белков одного семейства или для белков нескольких семейств, выполняющих схожие функции (Sulkowska et al., 2012b; Rawdon et al., 2013). Так, например, одинаковы матрицы узлов убиквитингидролаз человека, дрожжей и малярийного плазмодия, несмотря на низкую аминокислотную гомологию этих белков. Несколько семейств трансмембранных белков прокариот, участвующих в транспорте метаболитов (пермеазы аминокислот, бактериальный аналог  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -зависимого транспортера нейротрансмиттеров,  $\text{Na}^+$ -зависимые транспортеры сахаров и т. д.), содержащих скользящий узел, также имеют очень похожие матрицы узлов (Sulkowska et al., 2012b). Подобная консервативность матриц узлов в белках позволяет предполагать, что узлы действительно выполняют важные функции.

### Функции узлов в белках

Функциональное назначение узлов остается неясным. Изначально предполагалось, что подобные элементы в структуре белков должны приводить к увеличению ста-

бильности белка в целом. Однако на Dg-CBD было показано, что какой-либо чрезвычайной устойчивости к механической денатурации белку наличие узла не придает (Bornschoegl et al., 2009). Все же считают, что узлы могут стабилизировать отдельные домены белков. Например, скользящие узлы в транспортных белках стабилизируют их трансмембранную часть, которая представляет собой канал, образованный из пучка  $\alpha$ -спиралей, скрепленных продетыми в них петлями (Sulkowska et al., 2012b). Стабилизирующее действие приписывается и скользящему узлу, найденному в бактериоцинах. Например, каналобразующий домен колхицина E3 скрепляет петлей, пересекающей участок полипептидной цепи и формирующей структуру, похожую на застежку (Sulkowska et al., 2012b). Другой возможной функцией узелковых элементов считается предотвращение деградации белка в клетке, поскольку подобные структурные элементы в белке являются стерическим препятствием для прохождения внутрь протеасом (Virnau et al., 2006; Huang, Makarov, 2008; Dzubiella, 2009).

В РНК-метилтрансферазах трилистный узел образует сайт связывания для кофактора S-аденозилметионина, т. е. важен для выполнения ферментативных функций белка (Nureki et al., 2002; Lim et al., 2003). Для карбоангидразы быка также было показано, что «развязывание» C-концевого узла приводит к потере белком ферментативной активности (Alam et al., 2002). Влияние узла на ферментативную активность белков было показано и для транскарбамилаз — ферментов, участвующих в биосинтезе аргинина. N-ацетилорнитинтранскарбамилаза ряда патогенных микроорганизмов содержит трилистный узел в отличие от гомологичных ему ферментов орнитинтранскарбамилаз бактерий, животных и человека. Здесь наличие узла меняет субстратную специфичность фермента: N-ацетилорнитинтранскарбамилаза способна связывать N-ацетил-L-орнитин, в то время как орнитинтранскарбамилазы связывают L-орнитин (Virnau et al., 2006).

В бактериальных фитохромах узелковым участкам приписывают несколько возможных функций: стабилизацию взаимодействия между доменами PAS и GAF; уменьшение нежелательных потерь энергии при изомеризации хромофора в процессе фотоконверсии, которая может быть связана с существенной подвижностью хромофорсвязывающего сайта; ограничение подвижности N-концевого участка и, таким образом, достижение правильного позиционирования Cys-остатка для эффективного взаимодействия с хромофором (Wagner et al., 2005).

### Фолдинг белков с узелковыми структурными элементами

Наши представления о процессах сворачивания и разворачивания белков, накопленные за последние десятилетия, касаются в основном фолдинга небольших глобулярных белков. Белки, которые содержат в своей структуре сложные элементы, могут обогатить наши знания о фолдинге белков. Поэтому изучение белков, которые содержат в своей структуре узлы, представляет большой интерес для понимания фолдинга белков в целом. Большинство теоретических и экспериментальных исследований фолдинга белков, имеющих узелковые элементы, выполнено на представителях класса РНК-метилтрансфераз (YibK и YbeA), которые содержат трилистный узел (Mal-



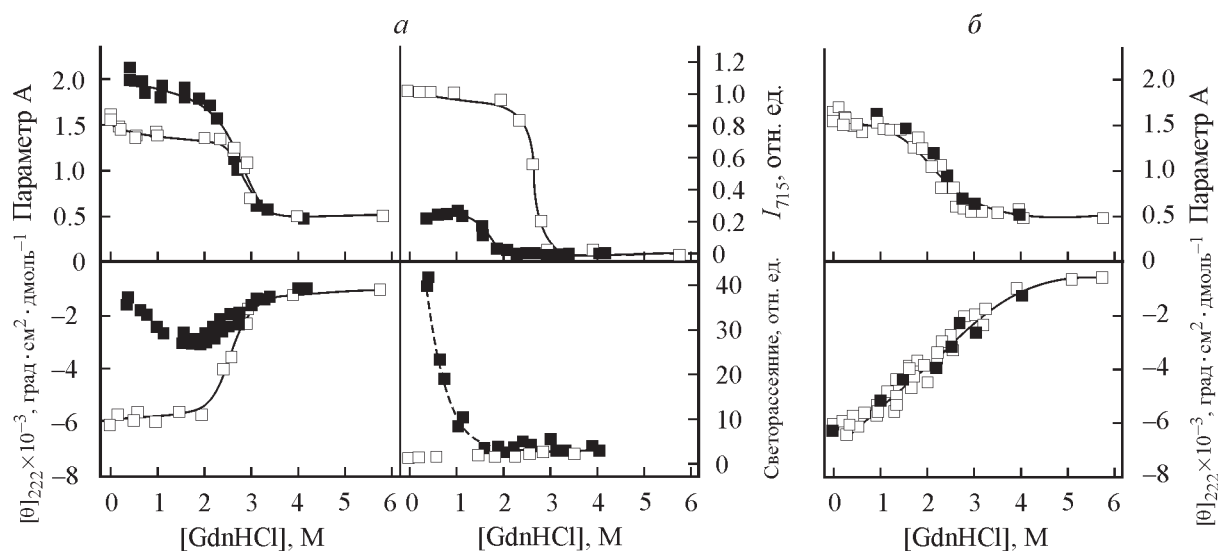


Рис. 2. Структурные переходы ближне-инфракрасного белка iRFP в холо- (а) и апоформах (б) под действием гуанидиндигидрохлорида (GdnHCl).

Показаны зависимости параметра  $A = I_{320}/I_{365}$  при длине волны возбуждения ( $\lambda_{\text{возб}} = 297$  нм), эллиптичности при 222 нм ( $\theta_{222}$ ), интенсивности флуоресценции  $I$  хромофора при длине волны регистрации 715 нм ( $\lambda_{\text{возб}} = 690$  нм) и интенсивности светорассеяния ( $\lambda_{\text{возб}} = \lambda_{\text{рег}} = 295$  нм). Светлые символы — разворачивание, темные — сворачивание.

lam, Jackson, 2005, 2006, 2007; Wallin et al., 2007; Mallam et al., 2008; Sulkowska et al., 2009, 2012a, 2013; Noel et al., 2010).

Теоретические исследования сворачивания YibK и YbeA позволили предложить механизм образования узла (Sulkowska et al., 2009, 2012a, 2013; Noel et al., 2010). Согласно этому механизму вначале формируется скрученная петля (twisted loop), через которую продевается короткий конец полипептидной цепи с образованием промежуточного состояния со скользящим узлом. Для образования более сложного узла в белке DehI предложен похожий механизм: на первом этапе полипептидная цепь сворачивается с образованием двух петель, на втором этапе через меньшую из них продевается С-конец полипептидной цепи также с образованием скользящего узла, на третьем этапе большая петля накидывается на меньшую петлю (Bolinger et al., 2010). Второй и третий этапы могут меняться местами. Во всех случаях зародышем для формирования узла является скрученная петля, образование которого направляется нативными контактами. Согласно другим теоретическим исследованиям, введение при моделировании сворачивания YibK ненативных взаимодействий существенно увеличивает вероятность образования узла (Wallin et al., 2007). Механизм образования узла при этом меняется существенно: вместо образования скользящего узла конец полипептидной цепи продевается в петлю и протягивается через нее дальше (как нитка в игольное ушко).

Эксперименты *in vitro* для белков YibK и YbeA показали, что денатурация этих белков под действием химических денатурантов полностью обратима (Mallam, Jackson, 2005, 2006), хотя процесс ренатурации этих белков довольно сложный и включает в себя этапы накопления кинетических промежуточных состояний (Mallam, Jackson, 2007). Показано также, что сворачивание вновь синтезированной полипептидной цепи во внеклеточной трансляционной системе является спонтанным процессом и корректный фолдинг этих сложных белков не требует участия шаперонов (Mallam, Jackson, 2011).

Наше изучение процессов денатурации (ренатурации) под действием химического денатуранта гуанидиндигидрохлорида (GdnHCl) бактериального фитохрома iRFP, состоящего из двух доменов PAS и GAF (рис. 2), на стыке которых расположен сложный узел типа «восьмерка», показало, что денатурация iRFP необратима, ренатурация белка осложняется агрегацией частичносвернутых молекул белка. В то же время денатурация iRFP в апоформе полностью обратима, т. е. наличие узла не препятствует эффективному фолдингу белка. Таким образом, необратимость денатурации iRFP и агрегация молекул белка связаны с наличием хромофора. Предполагается, что функционально активные участки или сложные структурные элементы в белках создают глубокие ловушки на энергетической поверхности и приводят к гистерезису денатурационных кривых, полученных при денатурации и ренатурации белка (Andrews et al., 2012; Stepanenko et al., 2013). Широко известным примером белка, для которого наблюдается явление гистерезиса денатурационных зависимостей, является зеленый флуоресцентный белок (Andrews et al., 2009). В этом случае гистерезис обусловлен наличием в структуре белка хромофора и необходимостью при ренатурации белка упаковки белковой глобулы вокруг хромофора, что требует изомеризации хромофора для достижения им необходимой конфигурации. В случае денатурации термофильной РНК-метилтрансферазы 106D также наблюдали явление гистерезиса, которое было объяснено необходимостью «завязывания» полипептидной цепи в узел перед сворачиванием белка (Andrews et al., 2012). Поэтому отсутствие гистерезиса при денатурации iRFP в апоформе может свидетельствовать об отсутствии глубоких ловушек на пути сворачивания белка.

Недавно было показано, что мутантные формы YibK и YbeA с введенными в С- и N-конец остатками Cys, подвергнутые окислению в нативном состоянии с образованием дисульфидной связи, имеют скорости ренатурации, сравнимые со скоростями ренатурации их восстановленных форм (Mallam et al., 2010). Поскольку окисленные

формы при денатурации не могут «развязаться», эти данные позволили сделать заключение о том, что денатурированные состояния YibK и YbeA дикого типа, полученные при инкубации этих белков в мочеvine, могут сохранять узел (Mallam et al., 2010). Недавно для другой метилтрансферазы из *Escherichia coli*, TrmD, методом безызлучательного переноса энергии от одиночных молекул белка, попарно меченных двумя красителями в разных позициях, также было показано сохранение узла в денатурированном состоянии, полученном при инкубации с GdnHCl в высокой концентрации (Wang et al., 2013). Предполагают, что сохранение в химически денатурированных белках узлов объясняет способность этих белков эффективно сворачиваться *in vitro*. Следует заметить, что при денатурации YibK, YbeA и TrmD тоже не наблюдается гистерезиса (Mallam, Jackson, 2007).

Экспериментальные данные, полученные для белков YibK и YbeA во внеклеточной трансляционной системе, которая, как полагают, наилучшим образом моделирует процессы *in vivo*, свидетельствуют о том, что образование узла происходит на первых этапах после синтеза полипептидной цепи и что этот процесс существенно ускоряется шаперонами (Mallam, Jackson, 2011). Предполагают, что образованное при этом промежуточное состояние, в котором несвернутая цепь завязана в узел, идентично денатурированным состояниям, полученным с помощью химических денатурантов, в которых также сохраняется узел (Mallam et al., 2010). Фолдинг YibK и YbeA происходит после образования узла и не зависит от шаперонов (Mallam, Jackson, 2011). Это позволило предположить, что образование узла может играть важную роль при фолдинге белков, содержащих узелковые структуры. Действительно, узелковые структуры в еще не свернутой полипептидной цепи могут значительно уменьшать число доступных для нее конформаций. Если мы представим себе энергетическую поверхность, характеризующую сворачивание белка с узлом, то ее основание будет существенно уже по сравнению с белком без узла. Можно предположить, что это будет ограничивать доступные для несвернутой цепи с узлом пути сворачивания, т. е. увеличивать вероятность пути сворачивания в нативное состояние и снижать возможность образования неправильно свернутого или агрегированного состояния. Если эти предположения верны, то узлы могут рассматриваться как «внутренние» шапероны, помогающие полипептидной цепи достичь нативного состояния (Mallam, Jackson, 2011).

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 8480), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-01842) и стипендии президента РФ (СП-65.2012.4).

### Список литературы

Abagyan R., Totrov M., Kuznetsov D. 1994. ICM—A new method for protein modeling and design: applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation. *J. Comput. Chem.* 15 : 488—506.

Alam M. T., Yamada T., Carlsson U., Ikai A. 2002. The importance of being knotted: effects of the C-terminal knot structure on enzymatic and mechanical properties of bovine carbonic anhydrase II. *FEBS Lett.* 519 : 35—40.

Andreeva A., Murzin A. G. 2010. Structural classification of proteins and structural genomics: new insights into protein folding and evolution. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 66 : 1190—1197.

Andrews B. T., Capraro D. T., Sulkowska J. I., Onuchic J. N., Jennings P. A. 2012. Hysteresis as a marker for complex, overlapping landscapes in proteins. *J. Phys. Chem. Lett.* 4 : 180—188.

Andrews B. T., Roy M., Jennings P. A. 2009. Chromophore packing leads to hysteresis in GFP. *J. Mol. Biol.* 392 : 218—227.

Auldridge M. E., Forest K. T. 2011. Bacterial phytochromes: more than meets the light. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 46 : 67—88.

Bellini D., Papiz M. Z. 2012. Dimerization properties of the RpBphP2 chromophore-binding domain crystallized by homologue-directed mutagenesis. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 68 : 1058—1066.

Blumenstein A., Vienken K., Tasler R., Purschwitz J., Veith D., Frankenberg-Dinkel N., Fischer R. 2005. The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr. Biol.* 15 : 1833—1838.

Bolinger D., Sulkowska J. I., Hsu H. P., Mirny L. A., Kardar M., Onuchic J. N., Virnau P. 2010. A Stevedore's protein knot. *PLoS Comput. Biol.* 6 : e1000731.

Bornschohl T., Anstrom D. M., Mey E., Dzubiella J., Rief M., Forest K. T. 2009. Tightening the knot in phytochrome by single-molecule atomic force microscopy. *Biophys. J.* 96 : 1508—1514.

Brandt S., von Stetten D., Gunther M., Hildebrandt P., Frankenberg-Dinkel N. 2008. The fungal phytochrome FphA from *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* 283 : 34 605—34 614.

Bryant T. N., Watson H. C., Wendell P. L. 1974. Structure of yeast phosphoglycerate kinase. *Nature.* 247 : 14—17.

Butler W. L., Norris K. H., Siegelman H. W., Hendricks S. B. 1959. Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 45 : 1703—1708.

Crippen G. M. 1974. Topology of globular proteins. *J. Theor. Biol.* 45 : 327—338.

De Riso V., Raniello R., Maumus F., Rogato A., Bowler C., Falciatore A. 2009. Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. *Nucleic. Acids. Res.* 37 : e96.

Dutta S., Burkhardt K., Young J., Swaminathan G. J., Matsuura T., Henrick K., Nakamura H., Berman H. M. 2009. Data deposition and annotation at the worldwide protein data bank. *Mol. Biotechnol.* 42 : 1—13.

Dzubiella J. 2009. Sequence-specific size, structure, and stability of tight protein knots. *Biophys. J.* 96 : 831—839.

Froehlich A. C., Noh B., Vierstra R. D., Loros J., Dunlap J. C. 2005. Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell.* 4 : 2140—2152.

Huang L., Makarov D. E. 2008. Translocation of a knotted polypeptide through a pore. *J. Chem. Phys.* 129 : 121107.

Hughes J., Lamparter T., Mittmann F., Hartmann E., Gartner W., Wilde A., Borner T. 1997. A prokaryotic phytochrome. *Nature.* 386 : 663.

Johnston S. C., Riddle S. M., Cohen R. E., Hill C. P. 1999. Structural basis for the specificity of ubiquitin C-terminal hydrolase. *EMBO J.* 18 : 3877—3887.

Kim E. E., Wyckoff H. W. 1991. Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis. *J. Mol. Biol.* 218 : 449—464.

King N. P., Yeates E. O., Yeates T. O. 2007. Identification of rare slipknots in proteins and their implications for stability and folding. *J. Mol. Biol.* 373 : 153—166.

Lai Y. L., Yen S. C., Yu S. H., Hwang J. K. 2007. pKNOT: the protein KNOT web server. *Nucleic Acids Res.* 35 : W420—W424.

Leung E. W., Guddat L. W. 2009. Conformational changes in a plant ketol-acid reductoisomerase upon Mg(2+) and NADPH binding as revealed by two crystal structures. *J. Mol. Biol.* 389 : 167—182.

- Lim K., Zhang H., Tempczyk A., Krajewski W., Bonander N., Toedt J., Howard A., Eisenstein E., Herzberg O. 2003. Structure of the YibK methyltransferase from *Haemophilus influenzae* (H10766): a cofactor bound at a site formed by a knot. *Proteins*. 51 : 56—67.
- Lua R.C., Grosberg A.Y. 2006. Statistics of knots, geometry of conformations, and evolution of proteins. *PLoS Comput. Biol.* 2 : e45.
- Mallam A. L., Jackson S. E. 2005. Folding studies on a knotted protein. *J. Mol. Biol.* 346 : 1409—1421.
- Mallam A. L., Jackson S. E. 2006. Probing nature's knots: the folding pathway of a knotted homodimeric protein. *J. Mol. Biol.* 359 : 1420—1436.
- Mallam A. L., Jackson S. E. 2007. A comparison of the folding of two knotted proteins: YbeA and YibK. *J. Mol. Biol.* 366 : 650—665.
- Mallam A. L., Jackson S. E. 2011. Knot formation in newly translated proteins is spontaneous and accelerated by chaperonins. *Nat. Chem. Biol.* 8 : 147—153.
- Mallam A. L., Morris E. R., Jackson S. E. 2008. Exploring knotting mechanisms in protein folding. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 105 : 18 740—18 745.
- Mallam A. L., Rogers J. M., Jackson S. E. 2010. Experimental detection of knotted conformations in denatured proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 107 : 8189—8194.
- Mansfield M.L. 1994. Are there knots in proteins? *Nat. Struct. Biol.* 1 : 213—214.
- Michel G., Sauve V., Larocque R., Li Y., Matte A., Cygler M. 2002. The structure of the RlmB 23S rRNA methyltransferase reveals a new methyltransferase fold with a unique knot. *Structure*. 10 : 1303—1315.
- Montgomery B. L., Lagarias J. C. 2002. Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant. Sci.* 7 : 357—366.
- Noel J. K., Sulkowska J. I., Onuchic J. N. 2010. Slipknotting upon native-like loop formation in a trefoil knot protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 107 : 15 403—15 408.
- Nureki O., Shirouzu M., Hashimoto K., Ishitani R., Terada T., Tamakoshi M., Oshima T., Chijimatsu M., Takio K., Vassylyev D. G., Shibata T., Inoue Y., Kuramitsu S., Yokoyama S. 2002. An enzyme with a deep trefoil knot for the active-site architecture. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 58 : 1129—1137.
- Onuchic J. N., Wolynes P. G. 2004. Theory of protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14 : 70—75.
- Piatkevich K. D., Subach F. V., Verkhusha V. V. 2013. Engineering of bacterial phytochromes for near-infrared imaging, sensing, and light-control in mammals. *Chem. Soc. Rev.* 42 : 3441—3452.
- Rawdon E. J., Millett K. C., Sulkowska J. I., Stasiak A. 2013. Knot localization in proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 41 : 538—541.
- Richardson J. S. 1977. Beta-sheet topology and the relatedness of proteins. *Nature*. 268 : 495—500.
- Rockwell N. C., Lagarias J. C. 2010. A brief history of phytochromes. *Chemphyschem.* 11 : 1172—1180.
- Rottwinkel G., Oberpichler I., Lamparter T. 2010. Bathy phytochromes in rhizobial soil bacteria. *J. Bacteriol.* 192 : 5124—5133.
- Schmidberger J. W., Wilce J. A., Weightman A. J., Whistock J. C., Wilce M. C. 2008. The crystal structure of Dehl reveals a new alpha-haloacid dehalogenase fold and active-site mechanism. *J. Mol. Biol.* 378 : 284—294.
- Stepanenko O. V., Stepanenko O. V., Kuznetsova I. M., Verkhusha V. V., Turoverov K. K. 2013. Beta-barrel scaffold of fluorescent proteins: folding, stability and role in chromophore formation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 302 : 221—278.
- Sulkowska J. I., Noel J. K., Onuchic J. N. 2012a. Energy landscape of knotted protein folding. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 109 : 17 783—17 788.
- Sulkowska J. I., Noel J. K., Ramirez-Sarmiento C. A., Rawdon E. J., Millett K. C., Onuchic J. N. 2013. Knotting pathways in proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 41 : 523—527.
- Sulkowska J. I., Rawdon E. J., Millett K. C., Onuchic J. N., Stasiak A. 2012b. Conservation of complex knotting and slipknotting patterns in proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 109 : E1715—E1723.
- Sulkowska J. I., Sulkowski P., Onuchic J. 2009. Dodging the crisis of folding proteins with knots. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 106 : 3119—3124.
- Takusagawa F., Kamitori S., Markham G. D. 1996a. Structure and function of S-adenosylmethionine synthetase: crystal structures of S-adenosylmethionine synthetase with ADP, BrADP, and PPI at 28 angstroms resolution. *Biochemistry*. 35 : 2586—2596.
- Takusagawa F., Kamitori S., Misaki S., Markham G. D. 1996b. Crystal structure of S-adenosylmethionine synthetase. *J. Biol. Chem.* 271 : 136—147.
- Taylor W. R. 2000. A deeply knotted protein structure and how it might fold. *Nature*. 406 : 916—919.
- Taylor W. R. 2005. Protein folds, knots and tangles. In: *Physical and numerical models in knot theory*. Singapore: World Scientific. 36 : 171—202.
- Taylor W. R. 2007. Protein knots and fold complexity: some new twists. *Comput. Biol. Chem.* 31 : 151—162.
- Turoverov K. K., Kuznetsova I. M., Uversky V. N. 2010. The protein kingdom extended: ordered and intrinsically disordered proteins, their folding, supramolecular complex formation, and aggregation. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 102 : 73—84.
- Van Roon A. M., Loening N. M., Obayashi E., Yang J. C., Newman A. J., Hernandez H., Nagai K., Neuhaus D. 2008. Solution structure of the U2 snRNP protein Rds3p reveals a knotted zinc-finger motif. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 105 : 9621—9626.
- Virnau P., Mallam A., Jackson S. 2011. Structures and folding pathways of topologically knotted proteins. *J. Phys. Condens. Matter*. 23 : 033101 (17 p).
- Virnau P., Mirny L. A., Kardar M. 2006. Intricate knots in proteins: function and evolution. *PLoS Comput. Biol.* 2 : e122.
- Wagner J. R., Brunzelle J. S., Forest K. T., Vierstra R. D. 2005. A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome. *Nature*. 438 : 325—331.
- Wagner J. R., Zhang J., Brunzelle J. S., Vierstra R. D., Forest K. T. 2007. High resolution structure of *Deinococcus bacteriophytochrome* yields new insights into phytochrome architecture and evolution. *J. Biol. Chem.* 282 : 12 298—12 309.
- Wallin S., Zeldovich K. B., Shakhnovich E. I. 2007. The folding mechanics of a knotted protein. *J. Mol. Biol.* 368 : 884—893.
- Wang P., Yang L., Liu P., Gao Y. Q., Zhao X. S. 2013. Single-molecule detection reveals knot sliding in TrmD denaturation. *Chemistry*. 19 : 5909—5916.
- Watters A. L., Deka P., Corrent C., Callender D., Varani G., Sosnick T., Baker D. 2007. The highly cooperative folding of small naturally occurring proteins is likely the result of natural selection. *Cell*. 128 : 613—624.
- Wu S. H., McDowell M. T., Lagarias J. C. 1997. Phycocyanobilin is the natural precursor of the phytochrome chromophore in the green alga *Mesotaenium caldariorum*. *J. Biol. Chem.* 272 : 25 700—25 705.

## KNOTTED PROTEINS

*Olesya V. Stepanenko*,<sup>1, \*</sup> *G. S. Bublikov*,<sup>1</sup> *Olga V. Stepanenko*,<sup>1</sup> *G.N. Rychkov*,<sup>2, 3</sup>  
*O. I. Povarova*,<sup>1</sup> *V. V. Verkhusha*,<sup>4</sup> *K. K. Turoverov*,<sup>1, 3</sup> *I. M. Kuznetsova*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg,

<sup>2</sup> St. Petersburg Nuclear Physics Institute NRC «Kurchatov Institute», Gatchina,

<sup>3</sup> St. Petersburg State Polytechnical University, and <sup>4</sup> Albert Einstein College of Medicine, New York, USA;

\* e-mail: lvs@incras.ru

For a long time the presence of knots in a protein structure was not admitted. However, the existence of proteins with various types of knots has now been proven. The functional significance of knotted topology remains unclear despite numerous assumptions. Studying the structure of knots in proteins and their impact on the acquisition of native structure of proteins is important for the understanding of protein folding as a whole. We review the types of knots in the proteins discovered to date, including trefoil knot, figure-of-eight knot, and more complex knots with 5 and 6 crossings of polypeptide chain. We survey the folding of knotted proteins as well.

**Key words:** knot, protein folding, trefoil knot, figure-of-eight knot, complex knots with 5 and 6 crossings.

---