

НАТИВНЫЕ ГЛОБУЛЯРНЫЕ И НАТИВНЫЕ ЧАСТИЧНО ИЛИ ПОЛНОСТЬЮ НЕУПОРЯДОЧЕННЫЕ БЕЛКИ. ФОЛДИНГ, ОБРАЗОВАНИЕ НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ, АГРЕГАЦИЯ

© К. К. Туроверов,¹ В. Н. Уверский,² И. М. Кузнецова¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,
и ² Центр компьютерной биологии и биоинформатики Отдела биохимии и молекулярной биологии
Института исследования нативно-несвернутых белков Медицинской школы Университета Индианы,
Индианаполис, Индиана 46202, США;
электронный адрес: ¹ kkt@mail.cytspb.rssi.ru, ² verversky@iupui.edu

В последние годы достигнуто понимание того, что белки могут быть функционально активны не только в глобулярном, но и в частично или полностью развернутом состоянии. Глобулярную структуру в нативном состоянии имеют в основном ферменты — белки, функция которых строго детерминирована. Белкам системы регуляции и передачи сигналов, участвующим во взаимодействии с большим числом партнеров, для функционирования требуется гораздо большая лабильность, и макромолекулы таких белков в нативном состоянии частично или полностью не структурированы. В настоящей работе предпринята попытка рассмотреть с единой точки зрения в рамках модели энергетической воронки существование нативных глобулярных белков, нативных частично или полностью неупорядоченных белков, образование белками межмолекулярных комплексов с различными партнерами, образование аморфных агрегатов и амилоидных фибрилл. Компактные глобулярные белки образуются в том случае, если полипептидная цепь обеспечивает существование сильных внутримолекулярных взаимодействий. Может ли полипептидная цепь свернуться в глобулу, зависит от соотношения числа гидрофобных и заряженных аминокислотных остатков, которые входят в ее состав. Многие частично или полностью неупорядоченные белки могут образовывать компактную структуру в комплексах со своими партнерами, которые образуются за счет межмолекулярных взаимодействий атомов полипептидной цепи белка и партнера. Межмолекулярные взаимодействия белковых молекул между собой могут приводить к образованию ассоциатов, аморфных агрегатов, амилоидоподобных и амилоидных фибрилл. Для возникновения таких контактов необходимо наличие гидрофобных участков полипептидной цепи, экспонированных растворителю. Поэтому агрегация частично или полностью неупорядоченных белков более вероятна по сравнению с глобулярными белками.

Ключевые слова: фолдинг белков, глобулярные белки, нативные неупорядоченные белки, белок-белковые и ДНК-белковые комплексы, аморфные агрегаты, амилоидные фибриллы, внутри- и межмолекулярные контакты.

В течение последних 50 лет понимание того, что представляет собой нативное состояние белка, как и за счет чего оно возникает, как происходят денатурация и ренатурация белка, претерпело существенные изменения. Долгое время считалось, что переход белка из нативного состояния в денатурированное является обратимым и осуществляется по принципу «все или ничего». Нативное состояние при этом ассоциировалось с компактным глобулярным состоянием, а денатурированное — с полностью развернутым состоянием, напоминающим состояние клубка для синтетических полимеров в хорошем растворителе. Представление о том, что в нативном состоянии белок имеет жесткую, строго упорядоченную структуру, нашло подтверждение в экспериментально установленной способности глобулярных белков в нативном состоянии образовывать кристаллы. Это обстоятельство позволило определить пространственную структуру многих белков вплоть до координат отдельных атомов методом

рентгеноструктурного анализа. Первыми были определены пространственные структуры гемоглобина и миоглобина (Kendrew et al., 1961; Perutz et al., 1963), а затем многих тысяч других белков. Информация о пространственной структуре белков содержится в международном Банке белковых структур — Protein Data Bank (PDB) (Bernt et al., 2003). На основании этих работ сложилось представление о нативном белке как о жесткой, строгой детерминированной структуре.

Конечно же, даже в этом случае все атомы белка в той или иной степени подвержены тепловому движению. Оказалось, что амплитуда тепловых колебаний отдельных атомов белка существенно зависит от того, какому участку структуры они принадлежат. Было показано, что большей подвижностью по сравнению с другими обладают атомы, входящие в состав концевых участков аминокислотной последовательности, петель и активных центров ферментов. Однако тепловые колебания атомов про-

исходят относительно положения равновесия и не нарушают целостности глобулы белка.

Высказывалось предположение о том, что равновесная динамика белка может иметь важное функциональное значение (Варшавский, 1979; Gurd, Rothgeb, 1979; Williams, 1979).

За последние 10 лет накопились данные, свидетельствующие о том, что многие белки могут выполнять свою функцию будучи частично или полностью неупорядоченными. Было установлено, что эти белки приобретают упорядоченное компактное состояние лишь в составе комплексов при взаимодействии с лигандами, другими белками или нуклеиновыми кислотами. Основная функция этих белков как раз и состоит в узнавании своих партнеров и образовании комплексов с ними (Dunker et al., 1998, 2001, 2002, 2005; Wright, Dyson, 1999; Uversky et al., 2000, 2005; Dunker, Obradovic, 2001; Tompa, 2002, 2005; Uversky, 2002, 2003a, 2003b; Daughdrill et al., 2005; Dyson, Wright, 2005; Fink, 2005). Поскольку признаком, определяющим нативность белка, является способность выполнять присущую ему функцию, такие частично или полностью неупорядоченные белки следует считать нативными.

Еще задолго до столь радикального изменения представлений о том, какими могут быть нативные белки, изменились также и представления о путях формирования нативного состояния и процессах их денатурации—ренатурации. Накопившиеся экспериментальные данные позволили заключить, что переход между нативным и полностью развернутым состояниями не обязательно осуществляется по принципу «все или ничего». В процессе этого перехода могут возникать стабильные стационарные или кинетические интермедиаты. О. Б. Птицыным была выдвинута гипотеза о существовании универсального промежуточного состояния (Ptitsyn, 1973), впоследствии получившего название «расплавленной глобулы» (Dolgikh et al., 1983; Ohgushi, Wada, 1983). Позже стало очевидно, что промежуточных состояний может быть несколько (Dobson, 1992; Uversky, 1993, 2003a; Uversky, Ptitsyn, 1996). Некоторые из этих состояний могут возникать на пути сворачивания, т. е. содержать элементы структуры, присутствующие в конечном состоянии; другие — вне этого пути. Например, при сворачивании β -лактоглобулина вначале образуются α -спирали, которые затем трансформируются в β -листы (Li et al., 2007). Долгое время считалось, что переход между нативным и денатурированными состояниями является обратимым, а возникновение агрегатов является экспериментальным артефактом. Однако появились убедительные данные о том, что многие тяжелые заболевания обусловлены нарушением фолдинга белков (конформационные болезни) и возникновением при этом агрегатов (аморфных агрегатов и амилонидных фибрилл) (см., например: Fink, 1998; Uversky et al., 1999a, 1999b). Это обстоятельство не только стимулировало изучение агрегированных форм белков, но также стало источником повышенного интереса и к проблеме фолдинга белка в целом.

Процесс образования белков в клетке состоит из двух этапов: биосинтеза полипептидной цепи и образования нативного состояния, т. е. достижения полипептидной цепью состояния, в котором белок становится функционально активным. Первый этап — сборка аминокислотной последовательности на основе информации, хранящейся в ДНК. Хотя этот процесс и является очень сложным, он хорошо изучен. Второй этап — формирование нативной структуры белка — изучен в значительно меньшей степе-

ни, и именно к нему в настоящее время приковано основное внимание исследователей.

Для того чтобы понять, что же происходит на этом этапе и какую структуру в конечном итоге будет иметь вновь синтезированная полипептидная цепь, необходимо учитывать действие двух фундаментальных законов природы. Фундаментальный закон физики позволяет утверждать, что изолированная полипептидная цепь должна принять конформацию, которая отвечает минимуму свободной энергии

$$F = H - TS,$$

где H — энтальпия, величина которой определяется возникающими между атомами полипептидной цепи взаимодействиями, а S — энтропия, являющаяся мерой числа конформаций N , которыми данное состояние белка может быть реализовано: $S = R \ln N$ (здесь R — молярная газовая постоянная, T — абсолютная температура). Таким образом, процесс фолдинга сводится к процессу достижения макромолекулой белка состояния, отвечающего минимуму свободной энергии. Необходимо иметь в виду, что наряду с единственным глобальным минимумом система может иметь и локальные минимумы. Наличие локальных минимумов свободной энергии может означать существование промежуточных состояний. Локальный минимум может быть и конечным состоянием системы, если он отделен от других более глубоких минимумов свободной энергии высоким энергетическим барьером.

Какое же состояние возникает после достижения молекулой минимума свободной энергии? Будет ли оно нативным? Для того чтобы ответить на эти вопросы, необходимо вспомнить о существовании еще одного фундаментального закона природы — биологического закона об эволюционном отборе. Аминокислотная последовательность должна быть такой, чтобы по достижении ею состояния, отвечающего минимуму свободной энергии, белок становился функционально активным — нативным. «Бессмысленные» аминокислотные последовательности, которые в состоянии, отвечающем минимуму свободной энергии, не выполняют никакой функции, должны быть отмечены эволюционным отбором.

Развернутое состояние может реализоваться большим числом конформаций за счет поворотной изомеризации по углам внутреннего вращения Φ и Ψ основной цепи (рис. 1). Поэтому оно выгодно энтропийно. Любое компактное состояние энтропийно невыгодно, оно стабилизируется за счет внутримолекулярных контактов. Компактизация структуры конкретной полипептидной цепи определяется ее способностью образовывать внутримолекулярные контакты, возникновение которых компенсирует возрастание свободной энергии за счет уменьшения энтропийной составляющей. Степень компактизации полипептидной цепи определяется ее аминокислотным составом и аминокислотной последовательностью. В зависимости от того, какова вновь синтезированная полипептидная цепь, могут возникать либо глобулярные структуры, либо частично или полностью неупорядоченные структуры. В любом случае полипептидные цепи в водном растворе образуют структуры, сильно отличающиеся от гауссова клубка. Это обусловлено тем, что вода является для полипептидной цепи плохим растворителем, хотя бы потому что в составе полипептидных цепей много гидрофобных аминокислот. Даже в концентрирован-

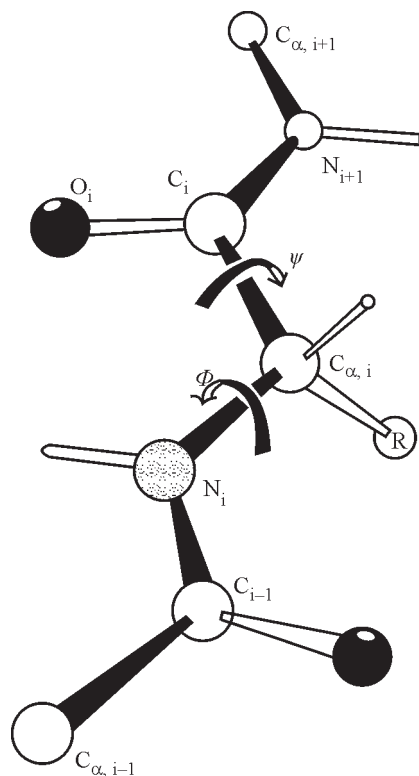


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая поворотную изомеризацию основной цепи аминокислотной последовательности по углам внутреннего вращения Φ и Ψ .

ных растворах денатурантов — 8 М мочеvine и 6 М гуанидингидрохлориде, которые являются для полипептидной цепи гораздо более хорошим растворителем по сравнению с водой, могут сохраняться элементы вторичной структуры (Shortle, Ackerman, 2001).

В настоящей работе предпринята попытка рассмотреть с единой точки зрения возникновение нативных глобулярных белков, нативных частично или полностью неупорядоченных белков, образование белками межмолекулярных комплексов с различными партнерами, образование агрегированных структур. Компактные глобулярные белки образуются в том случае, если полипептидная цепь обеспечивает существование сильных внутримолекулярных взаимодействий. Комплексы частично или полностью неупорядоченных нативных белков с партнерами образуются за счет межмолекулярных взаимодействий атомов полипептидной цепи белка и партнера. Межмолекулярные взаимодействия неупорядоченных участков нативных белков и белков в денатурированных частично свернутых промежуточных состояниях могут приводить к образованию ассоциатов, аморфных агрегатов, амилоидоподобных и амилоидных фибрилл.

Фолдинг глобулярных белков

Многие белки в водном растворе имеют жесткую, глобулярную структуру и только по достижении этого состояния становятся функционально активными. Такие белки называются глобулярными. Нативное состояние глобулярных белков реализуется одной-единственной конформацией. С энтропийной точки зрения это очень невыгодно. Следовательно, полипептидные цепи глобуляр-

ных белков должны быть такими, что значительное возрастание свободной энергии за счет уменьшения энтропийного члена при образовании компактного глобулярного состояния полностью компенсировалось бы уменьшением свободной энергии за счет возникающих взаимодействий. Определяющую роль в формировании компактной структуры нативного глобулярного белка играют гидрофобные взаимодействия (Финкельштейн, Птицын, 2005).

Хотя глобулярные белки в нативном состоянии имеют четко выраженную пространственную структуру, тем не менее степень упорядоченности различных участков аминокислотной последовательности может быть различной. В первую очередь об этом свидетельствуют данные рентгеноструктурного анализа. Большим значением фактора B , характеризующего подвижность атомов белка, обладают участки полипептидной цепи, входящие в состав активного центра ферментов. Кроме того, в глобулярных белках могут существовать неструктурированные участки — концевые участки, петли и т. д. (которые не видны при рентгеноструктурном анализе и соответствуют областям с отсутствующей электронной плотностью).

Вопрос о том, как глобулярные белки сворачиваются в уникальное, компактное, высокоорганизованное, функционально активное состояние, является одним из наиболее интригующих вопросов физики белка. Решение проблемы фолдинга глобулярных белков лежит на стыке биологии, физики и химии, и нет другой области исследований, где бы эти науки так перекрывались (Финкельштейн, Птицын, 2005).

Первые свидетельства того, что вся информация, необходимая для сворачивания глобулярного белка, заложена в его аминокислотной последовательности, была получена в работах Анфинсена (Anfinsen et al., 1961; Anfinsen, 1973), показавшего экспериментально, что рибонуклеаза А, денатурированная мочевиной в присутствии агента, разрушающего связи S—S, восстанавливает полностью нативную структуру и ферментативную активность после удаления денатуранта и агента, разрушающего эти связи. В последующем способность к ренатурации *in vitro* была установлена для многих других белков. Таким образом, информация о пространственной структуре нативного состояния макромолекулы белка запрограммирована его аминокислотной последовательностью, а значит, последовательностью пар нуклеотидов ДНК. Поэтому иногда говорят, что информация о пространственной структуре белка является второй частью генетического кода.

Интересно отметить, что принципы кодировки нативной пространственной структуры белка принципиально отличаются от принципа кодировки его аминокислотной последовательности (рис. 2). При синтезе белка последовательно, шаг за шагом, считывается информация, закодированная в нуклеотидах, и 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 нативного белка, участвуют удаленные по цепи аминокислотные остатки. При этом определяющую роль в фолдинге белка играют лишь некоторые (далеко не все)

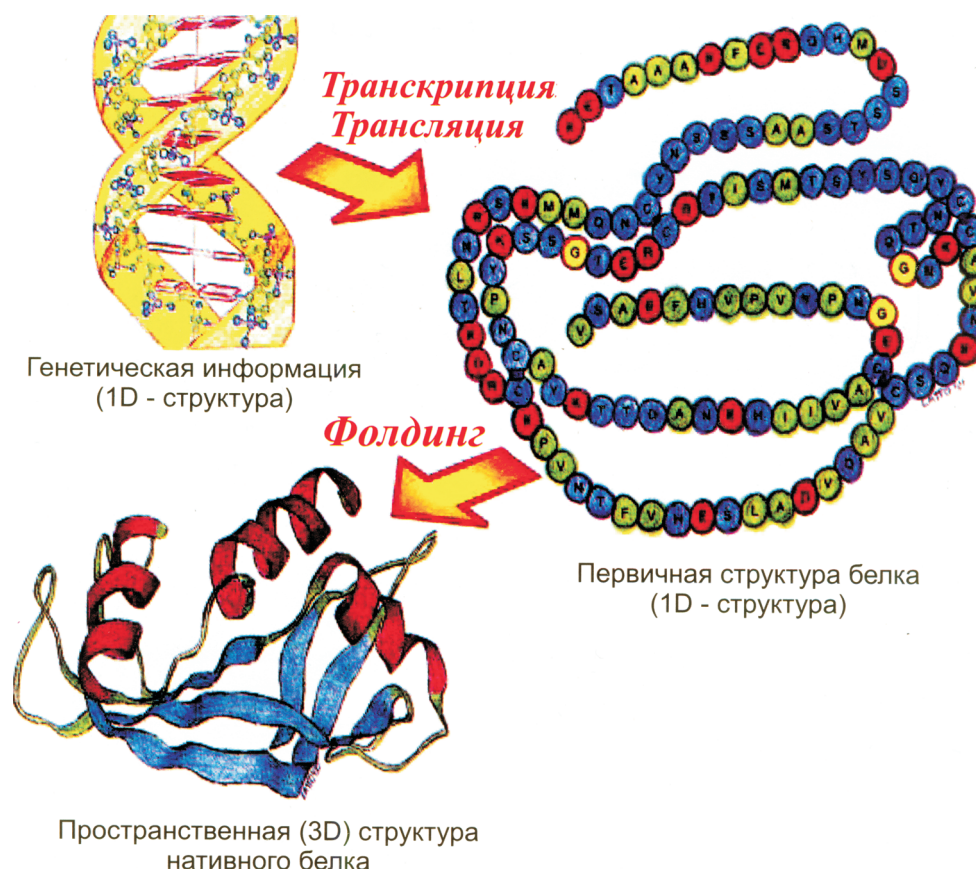


Рис. 2. Схема, иллюстрирующая место фолдинга в процессе образования нативной глобулярной структуры белка.

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 аминокислотной последовательности, строится его нативная трехмерная (3D) структура (по: Plotkin, Onuchic, 2002, с модификациями).

аминокислотные остатки. По этой причине гомологичные белки (даже с низкой гомологией) имеют сходную пространственную структуру. С другой стороны, одна-единственная аминокислотная замена может оказать существенное влияние на скорость сворачивания или даже полностью нарушить правильное сворачивание белка.

Некоторые глобулярные белки приобретают нативную глобулярную структуру только после связывания лигандов. В качестве характерного примера можно назвать глобулярный актин. Потеря лигандов (иона Ca и АТФ), как известно, приводит к денатурации, сопровождающейся существенным разворачиванием структуры (Kuznetsova et al., 1988, 1999; Поварова и др., 2005; Altschuler et al., 2005; Altschuler, Willison, 2008). Не исключено, что белки, нативная структура которых должна быть стабилизирована лигандами, не могут перейти в нативное состояние самопроизвольно. Для фолдинга некоторых из этих белков, т. е. для образования функционально активной структуры, в клетке существует специальная система помощников (см. раздел «Сворачивание белков *in vivo*»).

Следует подчеркнуть, что ренатурация белков обычно происходит очень быстро, часто за доли секунды. В то же время для перебора всех возможных конформаций в поисках нативного состояния, отвечающего минимуму свободной энергии, потребовалось бы слишком много времени — миллиард лет для молекулы из 100 аминокислот. На это обстоятельство впервые обратил внимание Левинталь (Levinthal, 1968). Таким образом, в аминокислотной последовательности запрограммирована не только

структура нативного состояния макромолекулы белка, но и путь ее достижения.

И наконец, еще одна особенность полипептидной цепи любого глобулярного белка: аминокислотная последовательность полипептидной цепи белка такова, что она обеспечивает существование свободноэнергетического барьера между нативным и денатурированным (развернутым или промежуточным) состояниями (Финкельштейн, Птицын, 2005). Это обстоятельство чрезвычайно важно для правильного функционирования глобулярных белков, так как только существование свободноэнергетического барьера между нативным и денатурированным состояниями белка приводит к тому что все молекулы глобулярных белков в нативном состоянии идентичны. Наиболее очевидным свидетельством идентичности всех макромолекул белка в нативном состоянии является способность глобулярных белков образовывать кристаллы.

Для объяснения сворачивания глобулярных белков было предложено несколько моделей. Модель «нуклеации—роста» предполагает, что процесс сворачивания белка подобен процессу кристаллизации и что лимитирующей стадией самоорганизации макромолекулы белка является стадия образования ядра сворачивания (Fersht, 1998; Radford, 2000). Эта модель хорошо объясняет процесс сворачивания небольших однодоменных белков, происходящий по принципу «все или ничего». В основе концепции «стадийного сворачивания» белка лежит представление о том, что процесс самоорганизации белковых молекул сопровождается формированием ряда промежу-

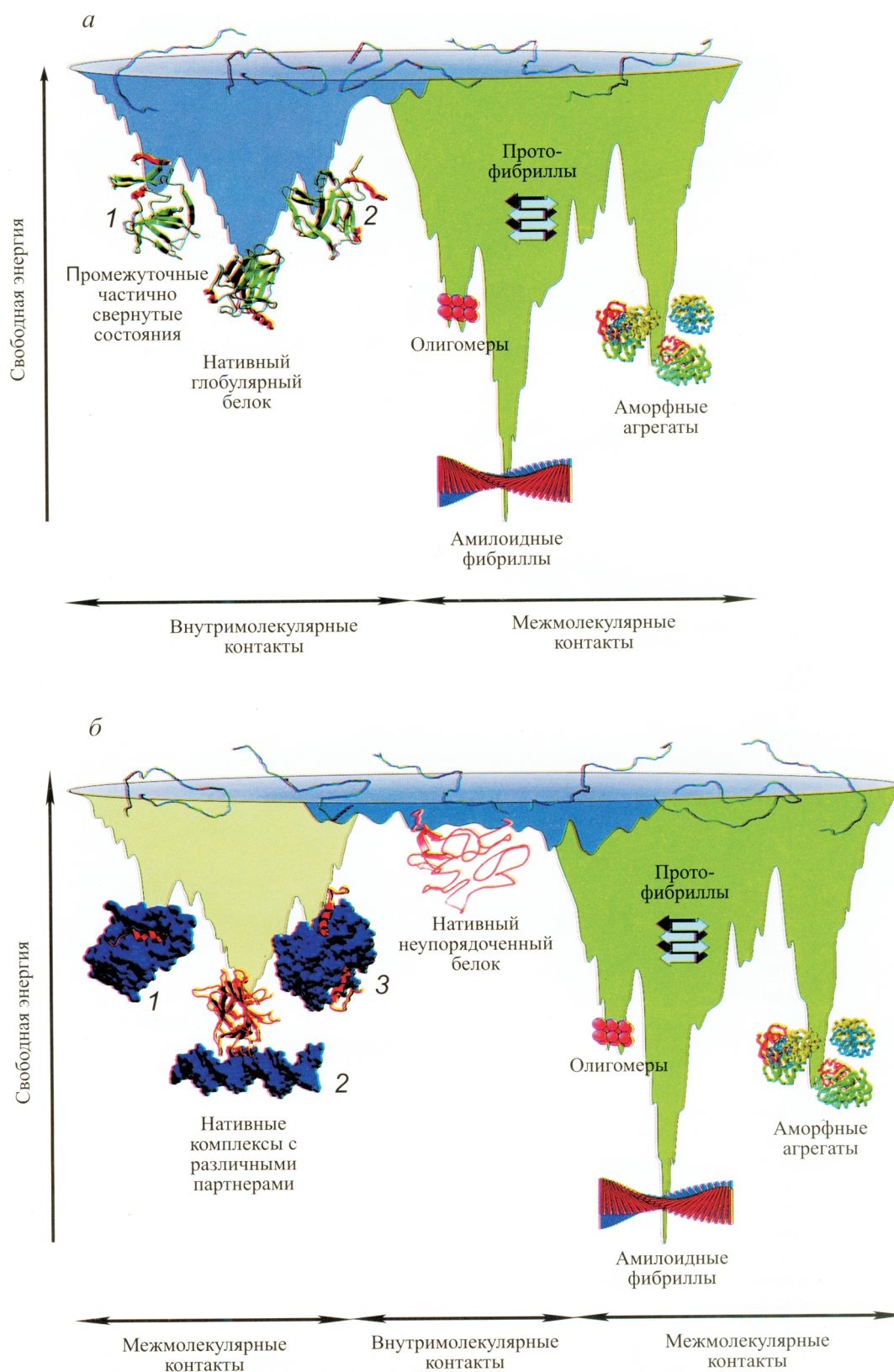


Рис. 3. Модель «энергетической поверхности», иллюстрирующая образование нативных глобулярных и нативных неупорядоченных белков, надмолекулярных комплексов, аморфных агрегатов и амилоидных фибрилл.

а — глобулярные белки. При сворачивании полипептидной цепи в компактное глобулярное состояние возрастание свободной энергии вследствие уменьшения энтропии компенсируется за счет возникновения внутримолекулярных контактов. Локальные минимумы свободной энергии на энергетической поверхности отвечают образованию промежуточных состояний. Межмолекулярные контакты белков в частично свернутых промежуточных состояниях могут приводить к образованию олигомеров, аморфных агрегатов и амилоидных фибрилл. 1, 2 — промежуточные частично свернутые состояния. *б* — внутренне неупорядоченные белки. Многие белки в водном растворе не способны образовывать компактное глобулярное состояние, но при этом являются функционально активными. Неупорядоченные полипептидные цепи таких белков могут образовывать компактную структуру

точных состояний с последовательным возрастанием степени упорядоченности (Ptitsyn, 1973; Dolgikh et al., 1981; Гильманшин и др., 1982). На первой стадии образуются зародыши α -спиралей и β -тяжей, которые на следующей стадии компактизируются с образованием промежуточного состояния. Задолго до появления убедительных экспериментальных данных О. Б. Птицыным была выдвинута идея о существовании универсального промежуточного частично свернутого состояния, в котором макромолекулы белка сохраняют компактность и выраженную вторичную структуру, присущую нативному состоянию, однако отличаются от нативной молекулы отсутствием жесткой упаковки боковых цепей (Ptitsyn, 1973). По совокупности перечисленных выше признаков это состояние было названо состоянием типа «расплавленной глобулы» (Dolgikh et al., 1983; Ohgushi, Wada, 1983). Дальнейшие исследования показали, что расплавленная глобула не является единственным частично свернутым состоянием и что при разворачивании—сворачивании многих белков наблюдается формирование по крайней мере еще одного интермедиата — предшественника расплавленной глобулы, обладающего свойствами, промежуточными между свойствами расплавленной глобулы и клубка (Uversky, Ptitsyn, 1994, 1996; Uversky, 2003a, 2003b).

Согласно современным представлениям, переход от полностью развернутого состояния в уникальное нативное состояние определяется энергетической поверхностью (Radford, 2000; Jahn, Radford, 2005), т. е. зависимостью свободной энергии макромолекулы белка от всех координат, определяющих состояние системы (модель «энергетических поверхностей»). Число возможных конформационных состояний полипептидной цепи уменьшается по мере приближения к нативному состоянию, поэтому такую энергетическую поверхность часто называют также «энергетической воронкой» (рис. 3). Модель энергетической воронки допускает существование различных путей образования нативного белка. Результаты экспериментальных исследований очень часто, казалось бы, подтверждают это представление и, в частности, создают иллюзию того, что характер процессов разворачивания зависит от выбора денатуранта. Представление о существовании различных путей разворачивания—сворачивания может возникнуть вследствие того, что под действием различных денатурантов (или различных концентраций одного и того же денатуранта) существенно изменяются скорости отдельных этапов этих процессов, так что не все этапы разворачивания—сворачивания будут регистрироваться в экспериментах. Наиболее ярко это было продемонстрировано на примере актина (Кузнецова и др., 2005; Povarova et al., 2007). Модель энергетической воронки позволяет наглядно представить не только образование компактного нативного состояния глобулярных белков, но и возникновение надмолекулярных комплексов частично или полностью неупорядоченных белков с партнерами (см. следующий раздел), а также ассоциатов, аморфных агрегатов, амилоидоподобных и амилоидных фибрилл (см. раздел «Амилоидоподобные и амилоидные фибриллы»).

Нативные частично или полностью неупорядоченные белки

На рубеже столетий стали появляться работы (и таких работ с каждым годом становится все больше), свидетельствующие о том, что многие белки не способны образовывать в водном растворе уникальную пространственную структуру, присущую глобулярным белкам, но при этом способны выполнять присущие им функции. Такие белки называли «нативно-денатурированными», «нативно-развернутыми» и т. п. В настоящее время их все чаще называют «внутренне неупорядоченными белками» (intrinsically disordered proteins; Uversky et al., 2005), подчеркивая, что неспособность образовывать глобулярную структуру является внутренним (неотъемлемым) свойством конкретной полипептидной цепи, обусловленным ее аминокислотной последовательностью и аминокислотным составом. На наш взгляд, не менее существенно подчеркнуть, что эти белки, не способные образовывать компактную глобулярную структуру, тем не менее являются нативными, т. е. выполняют важные биологические функции. Поэтому мы будем называть эти белки «нативными частично или полностью неупорядоченными». Следует отметить, что к числу нативных стали относить также глобулярные белки в частично свернутых промежуточных состояниях типа расплавленной глобулы, предшественника расплавленной глобулы и т. п. (Сердюк, 2007). С нашей точки зрения, это вряд ли оправданно.

Признаками неупорядоченности нативной структуры белка могут служить невозможность получения кристаллов белка, отсутствие выраженной структуры спектров кругового дихроизма в ближней и(или) дальней УФ-областях спектра, большие гидродинамические размеры макромолекулы и т. п. Основным признаком частичной неупорядоченности является невозможность определения координат атомов части аминокислот полипептидной цепи методом рентгеноструктурного анализа. Методы, используемые для анализа структурных свойств нативных частично или полностью неупорядоченных белков, детально описаны (см. обзор: Receveur-Bréchet et al., 2006).

Одно из наиболее реалистичных предположений состоит в том, что способность полипептидной цепи образовывать глобулярную структуру связана с величиной суммарного заряда (неважно какого знака) и числом гидрофобных остатков (рис. 4). Чем меньше удельный вес аминокислот с гидрофобными боковыми радикалами и чем больше суммарный заряд полипептидной цепи, тем меньше вероятность образования этой полипептидной цепи компактной глобулярной структуры (Uversky et al., 2000, 2007).

Эти предположения легли в основу алгоритма CN-plot, позволяющего предсказать, может ли данная аминокислотная цепь образовать компактную глобулярную структуру или нет (Uversky et al., 2000). Детальное сравнение частично или полностью неупорядоченных белков и глобулярных белков показано что их аминокислотные последовательности существенно различаются по

при взаимодействии с партнерами, если свободная энергия возникающего при этом комплекса меньше свободной энергии белка и его партнера до взаимодействия. Потенциальная способность частично или полностью неупорядоченных белков к взаимодействию с различными партнерами является основой выполнения такими белками их функции, которая состоит в специфическом узнавании партнеров (лигандов, других белков, нуклеиновых кислот и т. д.), образовании с ними комплексов и участии за счет этого в передаче сигналов, контроле и регуляции различных внутриклеточных процессов. В отличие от глобулярных белков, для которых переходу в состояние амилоидных фибрилл должно предшествовать их разворачивание, неупорядоченные белки всегда готовы к такого рода межмолекулярным взаимодействиям. 1–3 — нативные комплексы с различными партнерами.

В основу рисунка положена модель энергетической воронки для глобулярных белков (Schultz, 2000; Jan, Redford, 2005).

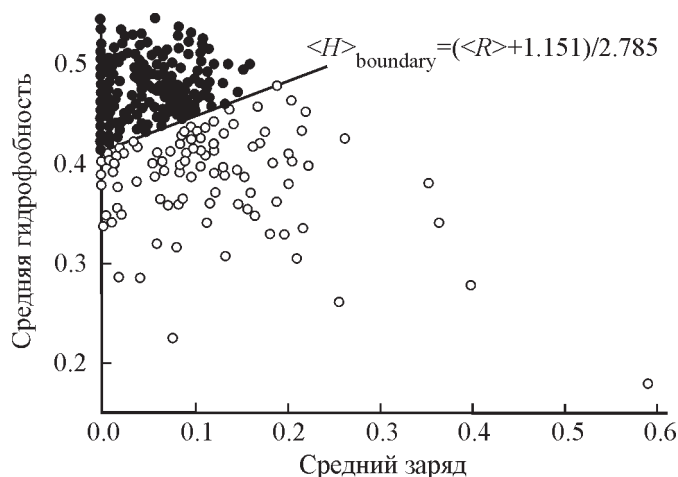


Рис. 4. Влияние соотношения средней гидрофобности и среднего заряда полипептидной цепи на ее способность образовывать компактную глобулярную структуру.

Каждому белку отвечает кружок на диаграмме. Представлены данные для 275 глобулярных белков (черные кружки) и 102 нативно-неупорядоченных белков (белые кружки) (Uversky, 2002).

целому ряду признаков. Например, последовательности частично или полностью неупорядоченных белков, как правило, содержат меньшее количество таких остатков, как триптофан, фенилаланин, тирозин, цистеин, валин, лецин и гистидин. В то же время количество полярных и заряженных остатков (включая лизин, аргинин, глутамин, аспарагин, глутаминовую и аспарагиновую кислоты, серин и треонин), а также количество пролинов в таких белках заметно превосходит соответствующие значения для глобулярных белков (Romero et al., 1997; Dunker et al., 1998). Указанные различия легли в основу программы PONDR, позволяющей предсказать частично или полностью неупорядоченные белки и белковые участки (Dunker et al., 2001). Существует также целый ряд других программ, ссылки на которые можно найти в обзоре Уверского с сотрудниками (Uversky et al., 2005). Анализ первичной структуры большого числа белков показал, что аминокислотные последовательности, не способные свернуться в глобулярную структуру, распространены в природе очень широко (Romero et al., 1998; Dunker et al., 2000; Ward et al., 2004; Oldfield et al., 2005). Длина аминокислотной последовательности, не способной образовать упорядоченную структуру, может быть разной (рис. 5). Белок может быть полностью неструктурированным или содержать отдельные элементы вторичной структуры. В некоторых белках полностью неструктурированным может быть один из доменов. Таким образом, спектр структурных свойств нативных частично или полностью неупорядоченных белков чрезвычайно широк. В литературе описаны как полностью неупорядоченные белки, так и белки, обладающие в нативном состоянии свойствами расплавленной глобулы или предшественника расплавленной глобулы (Dunker, Obradovic, 2001; Uversky, 2002, 2003a, 2003b; Daughdrill et al., 2005). Существование небольших отрезков полипептидной цепи, не участвующих в образовании элементов вторичной структуры, давно известно. У некоторых белков, которые принято считать глобулярными, неструктурированными являются N- и C-концевые участки полипептидной цепи и ее петлевые участки, шарнирные участки, связывающие два домена. Таким образом, поскольку степень неупорядоченности в

белках может быть очень разной, граница между глобулярными и частично неупорядоченными нативными белками условна.

Атомы аминокислотных остатков неструктурированных белков полипептидной цепи обладают высоким уровнем подвижности и поэтому не могут быть определены методом рентгеноструктурного анализа. В случае глобулярных белков большей подвижностью обладают атомы аминокислотных остатков, входящих в состав активного центра ферментов или в петлевые участки, которые также участвуют во взаимодействии с партнерами и таким образом несут функциональную нагрузку. Например, в полимеризации актина участвуют петлевые сегменты (Holmes et al., 1990). Из этого следует, что для функционирования глобулярных белков также необходим определенный уровень подвижности. Большинство глобулярных белков — это ферменты, каждый из которых выполняет строго специализированную функцию. Поэтому понятно, что у ферментов высокой подвижностью должен обладать только активный центр, а вся молекула должна быть жесткой.

Неупорядоченные полипептидные цепи, не способные образовать компактную глобулярную структуру за счет самоорганизации, могут образовать компактную структуру при взаимодействии с партнерами, если свободная энергия возникающего при этом комплекса меньше свободной энергии белка и его партнера до взаимодействия (рис. 3, б). Потенциальная способность частично или полностью неупорядоченных белков к взаимодействию с различными партнерами является основой выполнения такими белками их функции, которая состоит в специфическом узнавании партнеров (лигандов, других белков, нуклеиновых кислот и т. д.), образования с ними комплексов и участия за счет этого в передаче сигналов, контроле и регуляции различных внутриклеточных процессов.

В этих процессах участвуют тысячи белков. Особое внимание исследователей привлекают узловые регуляторные белки, играющие ключевую роль в этих сложных процессах, являющиеся фактически их «дирижерами» и получившие в литературе название хабов (hubs) — сетевых концентраторов (Uversky et al., 2005, 2008). К числу таких белков относятся, например, синуклеин, белок p53, белки HMG, рецептор эстрогена- α и ряд других. Ввиду своей функциональной значимости каждому из этих белков посвящены тысячи работ, в которых рассматривается та или иная функция этих белков, и ряд обзоров, в которых раскрывается их функциональная роль в клетке в целом. Например, в обзоре Чумакова (2007) очень ярко показаны многогранность функций белка p53, многообразие сигналов, поступающих на p53 со стороны всевозможных процессов внутри и вне клетки, а также многовариантность ответов клетки на проявление активности p53. Сведения о функциональной роли белков семейства HMG можно найти в обзорных работах (Muller et al., 2001; Reeves, Beckerbauer, 2001; Rovere-Querini et al., 2004; Palumbo 2007). Обзор уникальной способности α -синуклеина связываться с многочисленными партнерами с образованием при этом различных структурных состояний дан в обзоре Уверского с сотрудниками (Uversky, 2003a, 2003b, 2007, 2008; Uversky et al., 2005). Хотя функция этого белка остается невыясненной, установлено, что он взаимодействует со многими белками, участвующими в процессах передачи сигнала, которые также взаимодействуют с другими хабами, такими как p53, HMG и актин. Из-за того что при взаимодействии с различными партнерами



Рис. 5. Разнообразие структурной упорядоченности в белках.

0 — полностью структурированная глобула белка, нет неупорядоченных участков полипептидной цепи; 1 — не упорядочены N- и C-концевые участки полипептидной цепи; 2 — не структурированы линкерные участки цепи; 3 — не структурированы петли; 4 — не структурирован один из двух доменов белка; 5 — структурированы лишь небольшие участки полипептидной цепи белка; 6, 7 — практически полностью неструктурированный белок. Неупорядоченные участки полипептидной цепи показаны красным цветом.

α -синуклеин принимает существенно различные конформации, его называют белком-хамелеоном (Uversky et al., 2005). По-видимому, в полной мере этот термин может быть применен и к другим белкам-хамеам, в частности к актину. Актин принято считать глобулярным белком. Однако наличие ряда петлевых участков позволяет рассматривать его и как белок с частично неупорядоченной структурой. Именно наличие таких неструктурированных участков в субдоменах 2, 3 и 1, 4 отвечает за полимеризацию глобулярного актина. В клетке актин может существовать не только в полимеризованной форме, но и в ра-

зобранном виде, по-видимому в комплексе с другими белками. Интересно отметить, что так называемый инактивированный актин, образующийся из глобулярного при различных воздействиях, образует упорядоченную структуру (гомогенный ассоциат), состоящую из 14—16 субъединиц (Turoverov et al., 1999, 2003; Kuznetsova et al., 2002; Povarova et al., 2007). Не исключено, что и эта форма актина может быть функционально значимой. Актин — не только один из основных компонентов системы мышечного сокращения и цитоскелета эукариотических клеток, он участвует также в процессах хемотаксиса,

межклеточных взаимодействиях, обнаруживается не только в цитоплазме, но также в ядре и межклеточном пространстве. Актин взаимодействует не только со многими минорными регуляторными белками системы мышечного сокращения, но также со многими белками, участвующими в передаче сигналов (Пинаев, 2009).

Исследования последних лет показали, что выполнять широкий спектр функций, связанных с контролем и регуляцией различных внутриклеточных процессов, могут лишь белки с неупорядоченной структурой, обеспечивающей их взаимодействие с многочисленными партнерами, образующими разветвленную цепь передачи сигналов (Uversky et al., 2008). Анализ аминокислотных последовательностей большого числа белков показал, что частично или полностью неупорядоченные белки чаще встречаются в клетках эукариот, чем прокариот и архе, что вполне отвечает более сложной системе регулирования и передаче сигналов у высших организмов (Romero et al., 1998; Dunker et al., 2000; Gunasekaran et al., 2003; Ward et al., 2004; Oldfield et al., 2005). Ярким примером этого является функционирование белка p53 в многоклеточном организме. Благодаря функции p53 отслеживаются, оцениваются и координируются практически все процессы внутри клетки, обеспечивая приоритет интересов организма над интересами отдельной клетки: клетка, получившая повреждение, должна либо ускорить процессы репарации, либо лишиться способности к делению или даже погибнуть вследствие апоптоза (Чумаков, 2007).

Интересно отметить, что интенсивное изучение белков, не имеющих уникальной пространственной структуры в нативном состоянии, было отчасти стимулировано обнаружением того факта, что эти белки накапливаются в клетках и тканях при различных заболеваниях. Например, белок p53 был обнаружен как белок, прочно связывающийся с большим Т-антигеном в трансформированной клетке. Затем накопление этого белка было обнаружено в клетках, трансформированных разными способами, а также в клетках опухолей человека. Полученные данные указывали на то, что белок p53 представляет собой маркер опухолевых клеток, причем частое обнаружение высоких уровней этого белка в клетках опухолей человека наводило на мысль о том, что с активацией онкогена p53 связана значительная часть онкологических заболеваний. И только через 10 лет после открытия белка p53 было установлено, что онкогенными свойствами обладал ген p53, содержащий точечные мутации. При экспрессии в клетках последовательностей гена p53, выделенных из нормальных клеток, онкогенных эффектов не наблюдалось, напротив, это приводило к подавлению деления клеток в культуре (Чумаков, 2007).

Изучение α -синуклеина было стимулировано тем, что этот белок был обнаружен в состоянии амилоидных фибрилл в качестве основного компонента бляшек в тканях мозга при заболевании Паркинсона (Uversky, 2007). Участие прионовых белков при заболеваниях инфекционной губчатой энцефалопатией у млекопитающих привело к интенсивному изучению прионов дрожжей и установлению того факта, что прионы являются терминаторами процесса транскрипции и обеспечивают выживание клеток дрожжей при различных стрессовых ситуациях (Allen et al., 2007).

Методами биоинформатики было установлено, что многие белки, вовлеченные в такие болезни, как рак (Iakoucheva et al., 2002), сердечно-сосудистые заболевания (Cheng et al., 2006), диабет (Uversky et al., 2008), нерв-

но-дегенеративные заболевания (Uversky, 2008) и многие другие, относятся к классу нативных частично или полностью неупорядоченных белков.

Амилоидоподобные и амилоидные фибриллы

Амилоидные фибриллы — не так давно открытое, по-видимому универсальное, состояние белковых макромолекул. Для все большего числа белков удается подобрать условия, при которых такие структуры возникают *in vitro*. Установлено, что амилоидные фибриллы разного происхождения имеют сходную морфологию. Они представляют собой длинные, неразветвленные структуры диаметром нескольких нанометров, образованные переплетением между собой протофибриллами, в которых β -слои ориентированы перпендикулярно оси фибриллы (Dobson, 2003).

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 фундаментальных проблем фолдинга белка, но имеют также существенное практическое значение для медицины (выяснение причин заболеваний, связанных с нарушением фолдинга белков) и биотехнологии (анализ причин возникновения неправильно свернутых агрегированных форм рекомбинантных белков и их аккумуляции в телах включения).

В рамках модели энергетической воронки можно получить очень наглядное (хотя и нестрогое) объяснение механизма возникновения конформационных болезней, например инфекционной губчатой энцефалопатии — болезни «коровьего бешенства». 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, что становится причиной развития этого заболевания. Существует ряд других тяжелых заболеваний (которые иногда называют конформационными болезнями), таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона и др., также связанных с нарушением правильного фолдинга белков и возникновением амилоидных фибрилл (Harper, Lansbury, 1997; Kelly, 1997). Интересно отметить, что эти болезни сопровождаются амилоидозом неупорядоченных белков — белка тау и синуклеина. 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.

Поскольку частично или полностью неупорядоченные белки и особенно белки-хабы играют ключевую роль в регулировании и координации различных биохимических процессов, происходящих в клетке, любые нарушения синтеза и структуры этих белков могут приводить к заболеваниям. Это обстоятельство позволяет по-новому взглянуть на причины болезней, связанных с возникновением амилоидных фибрилл. Если какой-то участок полипептидной цепи еще не вовлечен в образование компактной структуры, то именно такой участок сохраняет потенциальную способность к взаимодействиям. Он может взаимодействовать со своими естественными партнерами с образованием нативных комплексов, но также он может участвовать в межмолекулярных взаимодействиях с образованием агрегированных структур. В отличие от глобулярных белков, для которых переходу в состояние амилоидных фибрилл должно предшествовать их разворачивание (Jahn, Radford, 2005), неупорядоченные белки всегда готовы к такого рода межмолекулярным взаимодействиям. Почему же тогда неструктурированные белки в норме не образуют агрегатов? Возможно, ответ на этот вопрос тот же, что и ответ на вопрос о том, почему неструктурированные белки в норме не подвержены действию протеаз. Предполагается, что неупорядоченные белки в клетке в основном существуют в составе упорядоченных компактных комплексов со своими партнерами (Dunker et al., 2002). И все же необходимо отметить, что многие конформационные болезни связаны с агрегацией именно неупорядоченных белков.

Напрашивается предположение о том, что возникновение амилоидных фибрилл является лишь одним из возможных проявлений заболеваний, связанных с нарушением синтеза неструктурированных белков, вовлеченных в клетке в процессы передачи сигналов и регулирования. В ходе исследования амилоидозов стало очевидным, что образование и накопление в соответствующих органах бляшек с высоким содержанием амилоидных фибрилл не являются причиной болезни. В настоящее время стали говорить о том, что токсичными являются протофибриллы (Bucciantini et al., 2002; Thirumalai et al., 2003). Но может быть истинная причина этих болезней вовсе не связана ни с ранними, ни с более поздними стадиями фибрилlogenеза, а обусловлена глубокими нарушениями в системе жизненно важных процессов, происходящих в клетке, побочным эффектом которых может стать возникновение амилоидных фибрилл? Возможно, возникновение протофибрилл также является следствием, а не причиной болезни.

Сворачивание белков *in vivo*

Сходя с рибосомы, вновь синтезированная полипептидная цепь попадает в «густонаселенную» среду клетки, содержащую белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и низкомолекулярные соединения, т. е. в условия молекулярного краудинга (crowding — столпотворение). В совокупности концентрация макромолекул в цитоплазме эукариотической клетки достигает величины 50—400 мг/мл, при этом молекулы занимают значительную часть объема среды — до 40 %. Такие условия могут оказывать существенное влияние на процессы фолдинга и функционирования белков (Чеботарева и др., 2004). В связи с этим фолдинг белков в клетке может быть осложнен по крайней мере двумя факторами: возникновением нежелательных контактов с соседними молекулами и возникновением

«неправильных» контактов внутри полипептидной цепи при котрансляционном фолдинге.

Поэтому при сворачивании белка *in vivo* участвует целый набор специальных «помощников» — шаперонов и ферментов, ответственных за цис- и трансизомеризацию пролина и образование «правильных» дисульфидных мостиков (Gilbert, 1994; Bader, Bardwell, 2002; Schmid, 2002). Шапероны способствуют котрансляционному сворачиванию полипептидных цепей, что особенно важно при синтезе больших мультидоменных белков, препятствуют агрегации денатурированных белков, участвуют в ликвидации неправильно свернутых молекул белка, ускоряют процесс перехода из промежуточного в нативное состояние, участвуют в транспорте белков к местам их назначения, в частности обеспечивают перенос белков через мембраны. Шапероны представляют собой обширное семейство белков с различными молекулярной массой, структурой и функцией. Наиболее существенную роль при фолдинге белков в клетках эукариот играют два класса АТФ-зависимых шаперонов — Hsp70 и шаперонины. Шапероны Hsp70 при содействии кошаперонов семейства DnaJ/Hsp70 связываются с небольшими гидрофобными участками полипептидной цепи сразу после биосинтеза (Feldman, Frydman, 2000). Это взаимодействие не является избирательным, поскольку кластеры гидрофобных аминокислот существуют практически у любой развернутой полипептидной цепи. Основная роль Hsp70, по-видимому, состоит в предотвращении нежелательных взаимодействий вновь синтезируемой полипептидной цепи с другими молекулами, которые могли бы приводить к агрегации. Для некоторых белков взаимодействие с Hsp70 оказывается достаточным для правильного сворачивания, однако для мультидоменных белков требуется участие других «помощников». Например, для сворачивания актина необходимо его взаимодействие с префолдином (PFD; Hansen et al., 1999; Martin-Benito et al., 2002), который участвует в транслокации частично свернутой цепи актина к шаперонину CCT (chaperon containing TCP-1, TCP-1 — tailless complex polypeptide-1), который является аналогом наиболее хорошо изученного шаперонина GroEL из *E. coli* (Feldman, Frydman, 2000; Carrascosa et al., 2001; Valpuesta et al., 2002; Neiryneck et al., 2006).

В отличие от Hsp70, CCT имеет специфические сайты связывания с актином и тубулином. Структура шаперонина прокариот и эукариот сходна (цилиндрические структуры, образованные наложенными друг на друга тороидами, состоящими из 7—9 мономеров), однако шаперонины простейших (GroEL в *E. coli*) и Hsp60 в митохондриях и хлоропластах образованы идентичными мономерами и не способны к специфическому связыванию с субстратом. Для работы им требуется наличие кошаперонов GroES или Hsp10 соответственно, которые закрывают вход в цилиндр после связывания с субстратом. CCT состоит из двух наложенных друг на друга тороидов, каждый из которых состоит из восьми трехдоменных белков. Экваториальные домены осуществляют связь между тороидами и взаимодействие с АТФ, а апикальные домены — связь с субстратом и прохождение субстрата в полость цилиндра, образованного этими тороидами. Показано, что фолдинг актина является многоступенчатым, АТФ-зависимым процессом, контролируемым CCT (рис. 6) (Neiryneck et al., 2006; Altschuler, Willison, 2008). Долгое время считалось, что шаперонин CCT специфически связывается только с актином и тубулином, однако к настоящему времени показано, что он участвует в процессе фолдинга еще ряда

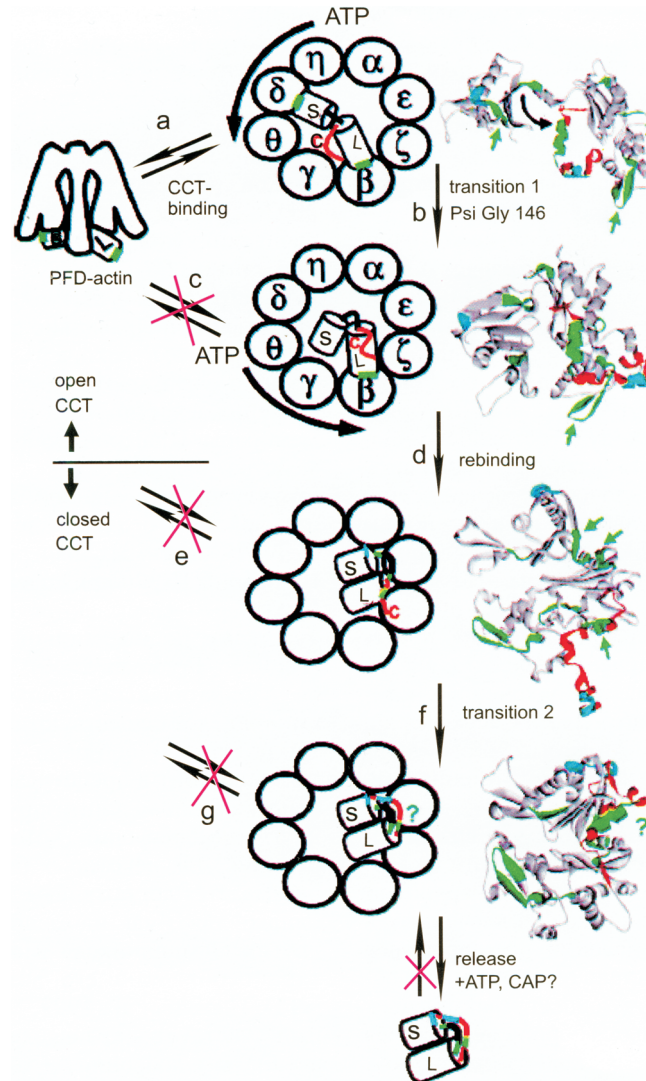


Рис. 6. Модель пошагового сворачивания актина с участием шаперонина CCT.

Греческими буквами обозначены субъединицы CCT; малый (S) и большой (L) домены актина представлены в виде цилиндров. Справа показана структура актина, соответствующая этапу сворачивания. Зеленым цветом обозначены места связывания с CCT, зеленые стрелки указывают на участок, который работает на соответствующем этапе. PFD-actin — актин в комплексе с префолдином (по: Neiryuck et al., 2006; печатается с любезного разрешения автора).

белков, некоторые из которых не гомологичны актину и тубулину (Willison, Grantham, 2001).

Несмотря на существенную роль шаперонов в фолдинге глобулярных белков *in vivo*, шапероны лишь способствуют фолдингу белков в клетке, но не несут той структурной информации, которая необходима вновь синтезируемой полипептидной цепи для приобретения ею жесткой глобулярной нативной структуры. По-видимому, еще большее значение для фолдинга и функционирования имеют взаимодействия с шаперонами и другими белками — партнерами для частично или полностью неупорядоченных белков. Такие взаимодействия должны предохранять эти белки от агрегации и протеолиза.

Заключение

До недавнего времени интерес физиков к изучению нативной структуры белков и их фолдинга в основном ограничивался глобулярными белками, все молекулы ко-

торых в нативном состоянии идентичны, вследствие чего их структура может быть определена методом рентгено-структурного анализа.

Изучение глобулярных белков было для физиков очень привлекательным: с одной стороны, объект был вполне адекватен тем методам, которые физики могли предложить для его изучения, с другой — исследователей привлекал масштаб задачи, состоящей в том, чтобы понять, почему полипептидная цепь белка, в отличие от цепи любого синтетического полимера, может принять уникальное, компактное, идентичное для всех макромолекул белка состояние. Хотя нельзя сказать, что эта проблема полностью решена, в понимании процессов фолдинга и функционирования глобулярных белков достигнут значительный прогресс.

Однако после того как стало ясно, что биологическую функцию могут выполнять не только глобулярные белки, но и белки, не имеющие жесткой пространственной структуры до взаимодействия с партнерами, стало очевидным, что глобулярные белки — лишь самый простой

предельный случай частично неструктурированного белка. Для понимания структуры и функции частично или полностью неструктурированных белков предстоит изучение белковых комплексов — задача гораздо более сложная по сравнению с задачей изучения структуры глобулярных белков. Решение этой задачи возможно только на основе тех знаний, которые были накоплены при изучении фолдинга глобулярных белков.

Понимание того, что большинство белков в принципе не способно к образованию упорядоченных глобулярных структур, а также достигнутое к этому времени понимание того, что неупорядоченные белки играют исключительно важную роль в различного рода клеточных процессах, вывели изучение этих белков на передний план развития науки.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», программы «Ведущие научные школы РФ» (проект НШ-1961.2008.4) и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 07-04-01454 и 07-04-01038).

Список литературы

- Варшавский Я. М. 1979. О динамических аспектах пространственной структуры биополимеров. В кн.: Физические методы изучения молекулярных и надмолекулярных структур. М.; Л.: Наука. 58—71.
- Гильманин 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.
- Кузнецова И. М., Форже В., Туроверов К. К. 2005. Структурная динамика, стабильность и фолдинг белков. Цитология. 47 (11) : 943—952.
- Пунаев Г. П. 2009. Сократительная система клеток: от подвижности к регуляции клеточных функций. Цитология. 51 (3) : 172—181.
- Поварова О. И., Кузнецова И. М., Туроверов К. К. 2005. Физико-химические свойства актина в различных структурных состояниях. Новые представления о процессах его сворачивания—разворачивания. Цитология. 47 (11) : 953—977.
- Птицын О. Б. 1973. Стадийный механизм самоорганизации белковых молекул. ДАН СССР. 210 : 1213—1215.
- Сердюк Н. Н. 2007. Структурированные белки и белки с внутренней неупорядоченностью. Молекуляр. биол. 41 (2) : 297—513.
- Финкельштейн А. В., Птицын О. Б. 2005. Физика белка. М.: КДУ. 456 с.
- Чеботарева Н. А., Курганов Б. И., Ливанова Н. Б. 2004. Биохимические эффекты молекулярного краудинга. Биохимия. 69 (11) : 1239—1251.
- Чумаков П. М. 2007. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме. Успехи биол. химии. 47 : 3—52.
- Allen K. D., Chernova T. A., Tennant E. P., Wilkinson K. D., Cherhoff Y. O. 2007. Effects of ubiquitin system alterations on the formation and loss of a yeast prion. J. Biol. Chem. 282 : 3004—3013.
- Altschuler G. M., Klug D. R., Willison K. R. 2005. Unfolding energetics of G- β -Actin: a discrete intermediate can be re-folded to the native state by CCT. J. Mol. Biol. 353 : 385—396.
- Altschuler G. M., Willison K. R. 2008. Development of free-energy-based models for chaperonin containing TCP-1 mediated folding of actin. J. R. Soc. Interface. 5 : 1391—1408.
- Anfinsen C. B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. Science. 181 : 223—230.
- Anfinsen C. B., Haber E., Sela M., White F. N. 1961. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 47 : 1309—1314.
- Bader M. V., Bardwell J. C. A. 2002. Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in *Escherichia coli*. Adv. Prot. Chem. 59 : 283—301.
- Berman H., Henrick K., Nakamura H. 2003. Announcing the worldwide Protein Data Bank. Nature Struct. Biol. 10 : 980.
- Bucciantini M., Giannoni E., Chiti F., Baroni F., Formigli L., Zurdo J., Taddei N., Ramponi G., Dobson C. M., Stefani M. 2002. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. Nature. 416 : 507—511.
- Carrascosa J. L., Llorca O., Valpuesta J. M. 2001. Structural comparison of prokaryotic and eukaryotic chaperonins. Micron. 32 : 43—50.
- Cheng Y., LeGall T., Oldfield C. J., Dunker A. K., Uversky V. N. 2006. Abundance of intrinsic disorder in protein associated with cardiovascular disease. Biochemistry. 45 : 10 448—10 460.
- Daughdrill G. W., Pielak G. J., Uversky V. N., Cortese M. S., Dunker A. K. 2005. Natively disordered proteins. In: Protein Folding Handbook. Pt II. Buchner J., Kiefhaber T. (Eds). Weinheim: Wiley-VCH. 275—357.
- 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. 426 : 884—890.
- Dolgikh D. A., Gilmanishin 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.
- Dunker A. K., Brown C. J., Lawson J. D., Iakoucheva L. M., Obradovic Z. 2002. Intrinsic disorder and protein function. Biochemistry. 41 : 6573—6582.
- Dunker A. K., Cortese M. S., Romero P., Iakoucheva L. M., Uversky V. N. 2005. Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks. FEBS J. 272 : 5129—5148.
- Dunker A. K., Garner E., Guillot S., Romero P., Albrecht K., Hart J., Obradovic Z., Kissinger C., Villafranca J. E. 1998. Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations. Pac. Symp. Biocomput. 473—484.
- Dunker A. K., Lawson J. D., Brown C. J., Williams R. M., Romero P., Oh J. S., Oldfield C. J., Campen A. M., Ratliff C. M., Hippes K. W., Ausio J., Nissen M. S., Reeves R., Kang C., Kissinger C. R., Bailey R. W., Griswold M. D., Chiu W., Garner E. C., Obradovic Z. 2001. Intrinsically disordered protein. J. Mol. Graph. Model. 19 : 26—59.
- Dunker A. K., Obradovic Z. 2001. The protein trinity-linking function and disorder. Nature Biotechnol. 19 : 805—806.
- Dunker A. K., Obradovic Z., Romero P., Garner E. C., Brown C. J. 2000. Intrinsic protein disorder in complete genomes. Genome Inform. Ser. Workshop. Genome Inform. 11 : 161—171.
- Dyson H. J., Wright P. E. 2005. Intrinsically unstructured proteins and their functions. Nature Rev. 6 : 197—208.
- Feldman D. E., Frydman J. 2000. Protein folding *in vivo*: the importance of molecular chaperones. Curr. Opin. Struct. Biol. 10 : 26—33.
- 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.
- Fink A. L. 2005. Natively unfolded proteins. Curr. Opin. Struct. Biol. 15 : 35—41.
- Gilbert H. F. 1994. Protein chaperones and protein folding. Curr. Opin. Struct. Biol. 5 : 534—539.
- Gunasekaran K., Tsai C. J., Kumar S., Zanuy D., Nussinov R. 2003. Extended disordered proteins: targeting function with less scaffold. Trends Biochem. Sci. 28 : 81—85.
- Gurd F. R., Rothgeb T. M. 1979. Motions in proteins. Adv. Protein Chem. 33 : 73—165.

- Jahn T. R., Radford S. E. 2005. The yin and yang of protein folding. *FEBS J.* 272 : 5962—5970.
- 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. *Ann. Rev. Biochem.* 66 : 385—407.
- Hansen W. J., Cowan N. J., Welch W. J. 1999. Prefoldin-nascent chain complexes in the folding of cytoskeletal proteins. *J. Cell Biol.* 145 : 265—277.
- Holmes K. C., Popp D., Gebhard W., Kabsch W. 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature.* 347 : 44—49.
- Iakoucheva L. M., Brown C. J., Lawson J. D., Obradovic Z., Dunker A. K. 2002. Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins. *J. Mol. Biol.* 323 : 573—584.
- Kelly J. W. 1997. Amyloid fibril formation and protein misassembly a structural quest for insight into amyloid and prion diseases. *Structure.* 5 : 595—600.
- Kendrew J. C., Watson H. C., Strandberg B. E., Dickerson R. E., Phillips D. C., Shore V. C. 1961. The amino-acid sequence x-ray methods, and its correlation with chemical data. *Nature.* 190 : 666—670.
- Kuznetsova I. M., Biktashev A. G., Khaitlina S. Yu., Vassilenko K. S., Turoverov K. K., Uversky V. N. 1999. Effect of self-association on the structural organization of partially folded proteins: inactivated actin. *Biophys. J.* 77 : 2788—2800.
- Kuznetsova I. M., Khaitlina S. Yu., Konditerov S. N., Surin A. M., Turoverov K. K. 1988. Changes of the structure and intramolecular mobility in the course of actin denaturation. *Biophys. Chem.* 32 : 73—78.
- Kuznetsova I. M., Stepanenko Olga V., Stepanenko Olesia V., Povarova O. I., Biktashev A. G., Verkhusha V. V., Shavlovsky M. M., Turoverov K. K. 2002. The place of inactivated actin and its kinetic predecessor in actin folding—unfolding. *Biochemistry.* 41 : 13127—13132.
- Levinthal C. 1968. Are there pathways for protein folding? *J. Chem. Phys.* 65 : 44—45.
- Li J., Shinjo M., Matsumura Y., Morita M., Baker D., Ikeguchi M., Kihara H. 2007. An alpha-helical burst in the src SH3 folding pathway. *Biochemistry.* 46 : 5072—5082.
- Martin-Benito J., Boskovic J., Gomez-Puertas P., Carrascosa J. L., Simons C. T., Lewis S. A., Bartolini F., Cowan N. J., Valpuesta J. M. 2002. Structure of eukaryotic prefoldin and of its complexes with unfolded actin and the cytosolic chaperonin CCT. *EMBO J.* 21 : 6377—6386.
- Müller S., Scaffidi P., Degryse B., Bonaldi T., Ronfani L., Agresti A., Beltrame M., Bianchi M. E. 2001. New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *EMBO J.* 20 : 4337—4340.
- Neirynek K., Waterschoot D., Vandekerckhove J., Ampe C., Rommelaere H. 2006. Actin interacts with CCT via discrete binding sites: a binding transition-release model for CCT-mediated actin folding. *J. Mol. Biol.* 355 : 124—138.
- Ohgushi M., Wada A. 1983. «Molten-globule state»: a compact form of globular proteins with mobile side-chains. *FEBS Lett.* 164 : 21—24.
- Oldfield C. J., Cheng Y., Cortese M. S., Romero P., Uversky V. N., Dunker A. K. 2005. Coupled folding and binding with alpha-helix-forming molecular recognition elements. *Biochemistry.* 44 : 12 454—12 470.
- Palumbo R., Galvez B. G., Pusterla T., De Marchis F., Cosu G., Marcu K. B., Bianchi M. E. 2007. Cells migrating to sites of tissue damage in response to the danger signal HMGB1 require NF-kappaB activation. *J. Cell Biol.* 179 : 33—40.
- Perutz M. F. 1963. X-ray analysis of hemoglobin. *Science.* 24 : 863—869.
- Plotkin S. S., Onuchic J. N. 2002. Understanding protein folding with energy landscape theory. Pt I. Basic concepts. *Quart. Rev. Biophys.* 35 : 111—167.
- Povarova O. I., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K. 2007. Different disturbances — one pathway of protein unfolding. Actin folding—unfolding and misfolding. *Cell Biol. Int.* 31 : 405—412.
- Radford S. 2000. Protein folding: progress made and promises ahead. *Trends Biochem. Sci.* 25 : 611—618.
- Receveur-Bréchet V., Bourhis J.-M., Uversky V. N., Canard B., Longhi S. 2006. Assessing protein disorder and induced folding. *Proteins.* 62 : 24—45.
- Reeves R., Beckerbauer L. 2001. HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim. biophys. acta.* 1519 : 13—29.
- Romero P., Obradovic Z., Kissinger C., Villafrance J. E., Dunker A. K. 1997. Identifying disordered regions in proteins from amino acid sequence. In: Proceedings of the International Conference on Neural Networks. 91—95.
- Romero P., Obradovic Z., Kissinger C. B., Villafranca J. E., Guillot S., Garner E., Dunker A. K. 1998. Thousands of proteins likely to have long disordered regions. *Pac. Symp. Biocomput.* 3 : 437—448.
- Rovere-Querini P., Capobianco A., Scaffidi P., Valentini B., Catalanotti F., Giazzon M., Dumitriu I. E., Müller S., Iannaccone M., Traversari C., Bianchi M. E., Manfredi A. A. 2004. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep.* 5 : 825—830.
- Schmid F. X. 2002. Prolyl isomerases. *Adv. Protein Chem.* 59 : 243—282.
- Schultz C. P. 2000. Illuminating folding intermediates. *Nat. Struct. Biol.* 7 : 7—10.
- Shortle D., Ackerman M. S. 2001. Persistence of native-like topology in a denatured protein in 8 M urea. *Science.* 293 : 487—489.
- Thirumalai D., Klimov D. K., Dima R. I. 2003. Emerging ideas on the molecular basis of protein and peptide aggregation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13 : 146—159.
- Tomba P. 2002. Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem. Sci.* 27 : 527—533.
- Tomba P. 2005. The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. *FEBS Lett.* 579 : 3346—3354.
- Turoverov K. K., Biktashev A. G., Khaitlina S. Yu., Kuznetsova I. M. 1999. The structure and dynamics of partially folded actin. *Biochemistry.* 38 : 6261—6269.
- Turoverov K. K., Verkhusha V. V., Shavlovsky M. M., Biktashev A. G., Povarova O. I., Kuznetsova I. M. 2002. Kinetics of actin unfolding induced by guanidine hydrochloride. *Biochemistry.* 41 : 1011—1019.
- 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. 2002. Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci.* 11 : 739—756.
- Uversky V. N. 2003a. Protein folding revisited. A polypeptide chain at the folding—misfolding—nonfolding cross-roads: which way to go? *Cell Mol. Life Sci.* 60 : 1852—1871.
- Uversky V. N. 2003b. A protein-chameleon: conformational plasticity of alpha-synuclein, a disordered protein involved in neurodegenerative disorders. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 21 : 211—234.
- Uversky V. N. 2007. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J. Neurochem.* 103 : 17—37.
- Uversky V. N. 2008. Amyloidogenesis of natively unfolded proteins. *Curr. Alzheimer Res.* 5 : 260—287.
- Uversky V. N., Gillespie J. R., Fink A. L. 2000. Why are «natively unfolded» proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins.* 41 : 415—427.
- Uversky V. N., Oldfield C. J., Dunker A. K. 2005. Showing your ID: intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling. *J. Mol. Recognit.* 18 : 343—384.
- Uversky V. N., Oldfield C. J., Dunker A. K. 2008. Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept. *Annu. Rev. Biophys.* 37 : 215—246.
- Uversky V. N., Ptitsyn O. B. 1994. «Partly folded» state, a new equilibrium state of protein molecules: four-state guanidinium chloride-induced unfolding of beta-lactamase at low temperature. *Biochemistry.* 33 : 2782—2791.
- 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., Radivojac P., Iakoucheva L. M., Obradovic Z., Dunker A. K. 2007. Prediction of intrinsic disorder and its use in functional proteomics. *Methods Mol. Biol.* 408 : 69—92.

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

Uversky V. N., Talapatra A., Gillespie J. R., Fink A. L. 1999b. Protein deposits as the molecular basis of amyloidosis. II. Localized amyloidosis and neurodegenerative disorders. *Med. Sci. Monitor.* 5 : 1238—1254.

Valpuesta J. M., Martin-Benito J., Gomez-Puertas P., Carras-cosa J. L., Willison K. R. 2002. Structure and function of a protein folding machine: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT. *FEBS Lett.* 259 : 11—16.

Ward J. J., Sodhi J. S., McGuffin L. J., Buxton B. F., Jones D. T. 2004. Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *J. Mol. Biol.* 337 : 635—645.

Williams R. J. 1979. The conformation properties of proteins in solution. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 54 : 389—437.

Willison K. R., Grantham J. 2001. The role of cytosolic chaperonin, CCT, in normal eukaryotic cell growth. In: *Molecular chaperones: frontiers in molecular biology*. Oxford: Oxford Univ. Press. 90—118.

Wright P. E., Dyson H. J. 1999. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J. Mol. Biol.* 293 : 321—331.

Поступила 13 X 2008

NATIVE GLOBULAR AND NATIVE PARTIALLY OR COMPLETELY DISORDERED PROTEINS. FOLDING, SUPRAMOLECULAR COMPLEX FORMATION AND AGGREGATION

K. K. Turoverov,¹ V. N. Uversky,² I. M. Kuznetsova¹

¹ Laboratory of structural dynamics, stability and folding of proteins, Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, Tikhoretsky ave, 4,
e-mail: kkt@mail.cytspb.rssi.ru,

and ² Institute for Intrinsically Disordered Protein Research, Center for Computational Biology and Bioinformatics, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202, USA,
e-mail: vuvversky@iupui.edu

Recently it became evident that proteins can perform their function not only in globular state but also in partially or completely disordered state. The majority of globular proteins are enzymes which function is strictly determined. Regulation and signaling proteins participating in interconnection with variety of partners must have much more lability, and macromolecules of such proteins are mainly in partially or completely disordered state. The aim of this work was to describe from the unified viewpoint in the frame of energy landscape model the existence of native globular, native partially or completely disordered proteins, formation of intermolecular complexes with various partners, formation of amorphous aggregates and amyloid fibrils. Compact globular proteins are formed if polypeptide chain provides strong intramolecular interconnections. The ability of polypeptide chain to fold in a compact globule depends on the relation of hydrophobic and charged aminoacids in its composition. Many partially or completely disordered proteins can form compact structure in complexes with their partners, which are composed by intermolecular interactions of polypeptide chains of protein and its partner. Intermolecular interaction of proteins can lead to formation associates, amorphous aggregates, amyloid and amyloid-like fibrils. The requisite condition of such contact formation is the availability of hydrophobic clusters of polypeptide chain exposed to the solution. That is why aggregation of partially or completely disordered proteins is more favorable in comparison with globular proteins.

Key words: protein folding, globular proteins, natively disordered proteins, protein—protein and DNA—protein complexes, amorphous aggregates, amyloid fibrils, inter- and intramolecular contacts.