

# ПРЕДСКАЗАНИЕ СКОРОСТЕЙ И ЯДЕР СВОРАЧИВАНИЯ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ ТЕОРИИ ИХ САМООРГАНИЗАЦИИ

© 2005 г.

А. В. ФИНКЕЛЬШТЕЙН,

Д. Н. ИВАНКОВ, О. В. ГАЛЗИТСКАЯ

*Институт белка РАН, Пущино, Московская область*

I. Введение. II. Загадка самоорганизации белка и ее решение. III. Оценка скорости сворачивания белка по его третичной, вторичной и первичной структуре. IV. Ядро сворачивания белковой глобулы. V. Заключение.

## I. ВВЕДЕНИЕ

Пространственная структура глобулярного белка, где каждый атом знает свое место, чрезвычайно сложна (рис. 1). И, тем не менее, если разрушить ее, если нагревом или определенными веществами развернуть белковую цепь *in vitro*, — эта структура способна спонтанно восстановиться («ренатурировать», «свернуться», «самоорганизоваться») [1–4]. Для этого нужно только, чтобы сохранилась химическая структура цепи белка — его аминокислотная последовательность, задаваемая геном. Значит, именно эта последовательность и определяет пространственную структуру белка.

---

*Принятые сокращения:* N — нативное состояние молекулы белка; D — денатурированное состояние молекулы белка; I — метастабильный интермедиат сворачивания; TS — переходное состояние (самое нестабильное состояние по ходу процесса).

*Адрес для корреспонденции:* e-mail: afinkel@vega.protres.ru

Работа поддержана Программой по молекулярной и клеточной биологии РАН (грант № 10002-251/П-10/145-161/140503-089), Программой «Ведущие Научные Школы» (грант № НШ-1968.2003.4), РФФИ (гранты № 04-04-49682 и № 05-04-48750-а) и Медицинским Институтом Говарда Хьюза (грант № 55000305).

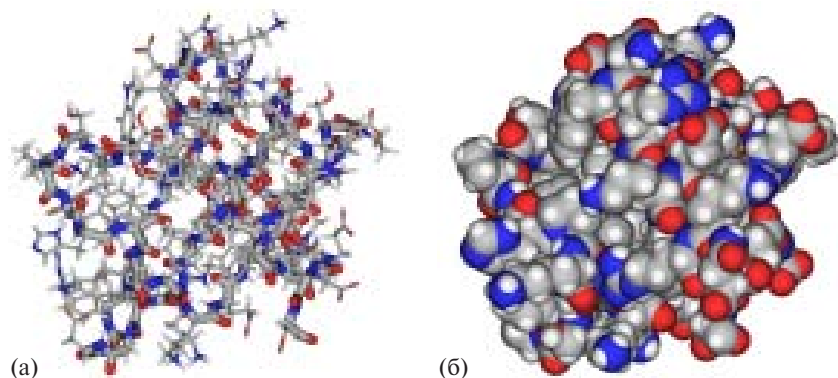


Рис. 1. (а) Скелетная модель небольшого глобулярного белка (интерлейкина 8), подчеркивающая сложность его пространственной структуры. Главная цепь белка показана толстой линией, боковые группы аминокислотных остатков — разнообразными тонкими отростками. (б) Объемно-атомная модель того же белка, подчеркивающая плотность упаковки его цепи (состоящей из 72 аминокислотных остатков и имеющей  $\approx 250$  Å в длину) в глобулу диаметром  $\approx 30$  Å.

Обе модели построены по одним и тем же трехмерным атомным координатам белка (расшифрованным при помощи рентгеноструктурного анализа и ядерного магнитного резонанса), взятым из Банка белковых структур [86]. Рисунок сделан программой Molscript [87]; атомы разных элементов раскрашены разными цветами.

Строго говоря, далеко не все белки, даже сохранившие в неприкосновенности свою исходную аминокислотную последовательность, ренатурируют *in vitro*. Бичом ренатурации является агрегация [1]. Поэтому к ренатурации обычно не способны белки, сложенные из многих полипептидных цепей. Сюда, прежде всего, относятся образующие крупные комплексы фибриллярные белки, а также многие большие, олигомерные глобулярные белки. Образование пространственной структуры этих белков *in vivo* часто не является самоорганизацией в строгом смысле. Оно обычно протекает только под опекой разнообразных шаперонов, препятствующих неспецифической агрегации входящих в комплекс белковых цепей, требует определенного порядка поступления этих цепей в комплекс, а зачастую (в особенности — у фибриллярных белков) — и направляемой разнообразными клеточными системами последовательной модификации этих цепей [2, 4]. С трудом поддаются ренатурации и мембранные белки, которые могут достичь своего функционального состояния только в присутствии липидов [5].

Поэтому в данной статье, целью которой является обзор современного понимания самоорганизации белковых структур, мы сосредоточимся, в основном, на сравнительно небольших водорастворимых глобулярных белках, ренатурация которых *in vitro* изучена лучше всего. При этом мы рассмотрим и основные экспериментальные факты, и те простые физические модели, что проясняют происходящие при самоорганизации белка процессы, позволяя при этом оценить скорость самоорганизации различных белков и выделить в них наиболее важные для самоорганизации части — «ядра сворачивания».

## II. ЗАГАДКА САМООРГАНИЗАЦИИ БЕЛКА И ЕЕ РЕШЕНИЕ

### СВОРАЧИВАНИЕ БЕЛКА

#### *In vivo*

В живой клетке белок синтезируется на рибосоме. Биохимический синтез белковой цепи занимает порядка минуты, да и все изготовление «готового», свернутого белка, занимает примерно столько же [6] — эксперимент не видит разницы. Поэтому естественно было предположить, что сворачивание белка может начинаться еще на рибосоме, до окончания полного синтеза белковой цепи, и начинаться с самоорганизации той части цепи, которая синтезируется раньше всего, т.е. ее N-конца [7].

И действительно, ряд опытов показал, что структура N-концевых доменов белковых цепей сворачивается «ко-трансляционно», еще до окончания полного синтеза рибосомой остальной цепи белка [8–10]. Показано также, что уже синтезированной рибосомой, но еще не свернувшихся цепей белка практически нет [11]. В то же время привлекательная гипотеза об особой роли N-конца цепи была опровергнута элегантными опытами Гольденберга и Крейтона [12], показавшими, что «циркулярная пермутация» белковой цепи, ставящая ее C-концевую половину перед N-концевой, не мешает самоорганизации ее правильной пространственной структуры. Сейчас циркулярная пермутация белковых цепей (правда, относительно небольших) стала уже рутинной процедурой в белковой инженерии [13, 14].

Сворачивание белка в клетке (в отличие от его самоорганизации *in vitro*) происходит в насыщенном макромолекулярном окружении. Это окружение создает угрозу и агрегации, и химического повреждения растущих сворачивающихся белковых цепей. Поэтому в клетке белковая цепь сворачивается под опекой не только рибосомы, но и специальных белков — шаперонов [15], защищающих растущую бел-

ковую цепь от нежелательных внешних воздействий. С другой стороны, некоторые ферменты ускоряют сворачивание белков, катализируя медленные сами по себе процессы (в частности, *цис-транс*-изомеризацию пролинов и образование — и распад — S—S связей [1, 2]).

Однако, нет оснований полагать, что что-то, кроме аминокислотной последовательности, определяет структуру белка в клетке [10, 15]. Опыты по сворачиванию белка *in vitro* показывают, что работа всей клеточной машинерии может быть заменена подбором соответствующих внешних условий (малой концентрации белка, нужного окислительно-восстановительного потенциала и т.д.). Эта замена не меняет результат сворачивания: уж если белок не выпал в осадок *in vitro*, а свернулся — то он свернулся в ту же структуру, что и *in vivo*. Правда, часто это займет больше (а иногда и меньше!) времени, чем самоорганизация *in vivo*, — но результат будет тот же. Похоже, что — помимо самого синтеза белковой цепи — биосинтетический аппарат клетки (рибосома + шапероны + ...) служит лишь чем-то вроде инкубатора для сворачивания пространственной структуры белка: этот «инкубатор» не определяет структуру белка, но он создает «тепличные» условия для ее созревания, — так же, как обычный инкубатор обеспечивает выведение птенца, не предопределяя, кто выведется — цыпленок или утенок.

К сожалению, экспериментальные данные об образовании пространственной структуры белка *in vivo* весьма скудны: очень трудно увидеть структурные превращения растущего белка на фоне всего клеточного супа. Поэтому для выяснения не только результата, но и хода процесса самоорганизации приходится исследовать самоорганизацию белка *in vitro*, в растворе (без всяких рибосом, шаперонов и т.д.).

### *In vitro*

Около 1960 г. Ч. Анфинсеном и его сотрудниками было сделано замечательное открытие, увенчанное впоследствии Нобелевской премией: глобулярный белок способен к спонтанной самоорганизации *in vitro* (ренатурации), если после биосинтеза он не подвергся сильной химической модификации. В этом случае его архитектура, «мягко» (без разрыва цепи) разрушенная температурой, растворителем и т.д., спонтанно восстанавливается при «нормализации» среды [16]. Правда, эффективная ренатурация нуждается в тщательном подборе экспериментальных условий — иначе ей может воспрепятствовать агрегация белка.

Чуть позже Р. Меррифилд показал, что спонтанно сворачиваются и химически синтезированные белки [17], в жизни своей не встречавшиеся ни с рибосомой, ни с шаперонами, ни с другой клеточной маши-

нерией (и, которые, следовательно, вопреки все еще проскальзывающим в литературе мнениям, никак не могли «запомнить ту пространственную структуру, что они получили *in vivo*»).

К настоящему времени ренатурация *in vitro* стала рутинным этапом выделения многих белков, — например, из находящихся в клетке тел включения.

### ЗАГАДКА САМООРГАНИЗАЦИИ ИЛИ «ПАРАДОКС ЛЕВИНТАЛЯ»

До недавнего времени было, однако, совершенно непонятно, как белок может обрести «свою» трехмерную структуру, выбрав ее среди громадного числа возможных. А число это — на это обратил внимание в 1968 г. С. Левинталь [18] — действительно огромно. Так как каждое звено (аминокислотный остаток) белковой цепи имеет 3—4 внутренних степеней свободы, то остаток имеет около 10 возможных конфигураций (это число подтверждается и термодинамическими опытами). Поэтому даже небольшая белковая цепь, состоящая из 100 звеньев, может принять  $\sim 10^{100}$  конфигураций. Их полный перебор потребовал бы  $\sim 10^{80}$  лет — занимая всего  $10^{-13}$  с (время тепловой флуктуации) на переход из одной конфигурации в другую. На этом фоне даже время жизни нашей Вселенной —  $10^{10}$  лет — величина бесконечно малая...

Исходя из этой оценки, Левинталь и сформулировал парадокс, позднее названный его именем. Он заключается в следующем. С одной стороны, природная («нативная») пространственная структура ведет себя, с точки зрения физика, как самая стабильная из всех возможных. В самом деле, белковая цепь приходит к ней в самых разных *по кинетике* процессах: и при сворачивании на рибосоме в процессе биосинтеза, и после протаскивания сквозь мембрану, и при сворачивании в пробирке — чем бы и как бы она ни была там развернута. С другой стороны, нет никаких гарантий, что эта нативная структура — действительно самая стабильная, самая устойчивая из всех возможных. У белковой цепи просто нет времени на то, чтобы перебрать *все* другие варианты и убедиться в этом, — а «почувствовать» стабильность каждой конфигурации белок может, только попав прямо в нее, — ведь отклонение даже на 1 Å может очень сильно повысить энергию цепи в плотной белковой глобуле (см. рис. 1). По той же причине ландшафт энергий белковой цепи должен быть очень холмист (см. рис. 3), и белковая цепь не может найти свою структуру, просто скатываясь под уклон.

«Как же белок находит свою структуру?» — спросил Левинталь, и ответил: «Видимо, самоорганизующийся белок следует по какому-то специальному, кодируемому его аминокислотной последовательностью пути сворачивания, и та структура, где этот путь заканчивается, — она и

служит нативной структурой белка, вне зависимости от того, есть ли еще более стабильная укладка его цепи, или нет». Иными словами, Левинталь предположил, что нативная структура белка находится под «кинетическим контролем» и определяется не стабильностью, не термодинамикой, а кинетикой процесса сворачивания (точнее — какими-то ее инвариантными, не зависящими от деталей процесса чертами) и соответствует не глобальному, а просто локальному, но быстро достижимому максимуму стабильности.

Парадокс Левинталя напоминает (по меткому выражению Е.И. Шахновича) Великую теорему Ферма и по обманчивой простоте формулировки, и по притягательности для все новых и новых поколений исследователей (и дилетантов). Правда, решить его удалось за 30, а не 300 лет.

Сложность проблемы заключается в том, что поднятый вопрос нельзя решить чисто экспериментально. Действительно: предположим, у белковой цепи есть другая, «ненативная», но еще более стабильная укладка. Как ее найти, если сам белок ее не находит? Ждать результата в течение  $10^{80}$  лет?!

В то же время, вопрос о том, что — кинетика или термодинамика — определяет укладку белковой цепи, отнюдь не чисто умозрительный. Он постоянно возникает, когда мы решаем конкретные задачи физики белка. Если мы предсказываем по аминокислотной последовательности форму его глобулы, — надо знать, что предсказывать: самую стабильную структуру или ту, которая быстрее всего получается. Если мы конструируем новый, не встречающийся в природе белок, — нужно знать, что делать: максимально усиливать стабильность желаемой структуры или пролагать наиболее быстрый путь к ней.

#### ИНТЕРМЕДИАТЫ СВОРАЧИВАНИЯ: ЧАСТИЧНОЕ РЕШЕНИЕ «ПАРАДОКСА ЛЕВИНТАЛЯ»

«Парадокс Левинталя» сконцентрировал внимание исследователей на путях сворачивания белков и на обнаружении и исследовании интермедиатов сворачивания белковых цепей. Некоторые экспериментальные данные, действительно, свидетельствовали о каких-то структурных изменениях денатурированных белковых цепей с изменением внешних условий [19], но природа этих изменений была неясна.

В 1973 г. О.Б. Птицын предложил модель стадийного механизма самоорганизации [20], оказавшую большое влияние на все последующие исследования. Эта модель постулировала последовательное вовлечение разных взаимодействий в формирование структуры белка, важную роль образования быстро формирующихся локальных структур ( $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -шпилек) при инициации сворачивания, последую-

щее их слипание в нативоподобную глобулу и окончательную кристаллизацию структуры белковой глобулы на последнем шаге самоорганизации.

#### Ключевой интермедиат: расплавленная глобула

Центральным элементом гипотезы О.Б. Птицына была «нативоподобная» глобула, ныне получившая широкую известность под именем «расплавленная глобула» («molten globule»). Она была экспериментально обнаружена на грани 1970-х—80-х гг., сначала — как стабильное состояние «слабоденатурированного» белка [21–23], а затем — и как метастабильный кинетический интермедиат сворачивания [24]. Эта глобула компактна, богата вторичной структурой, но ее боковые группы не упорядочены [25].

Оказалось, что при сворачивании *in vitro* многих (но не всех) глобулярных белков при физиологических условиях расплавленная глобула является хорошо наблюдаемым кинетическим интермедиатом [25–28]. Она образуется за миллисекунды, а полная ренатурация белка обычно требует на несколько порядков больше времени [29]. Таким образом, скорость ренатурации белка лимитируется кристаллизацией расплавленной глобулы, а не ее образованием.

Расплавленной глобуле предшествует сверхбыстрое [30] образование «пред-расплавленной глобулы» — довольно богатой вторичной структурой, но не очень компактной [31]; такое состояние белковой цепи на ранней стадии сворачивания также было предсказано О.Б. Птицыным еще в 1973 г. [20].

Помимо расплавленной (и пред-расплавленной) глобулы, наблюдаются и другие кинетические интермедиаты. Однако их образование требует взаимодействий, существующих не в каждой белковой цепи (например [1], образования S-S связей), и потому эти интермедиаты не универсальны.

#### Интермедиаты сворачивания могут ускорить самоорганизацию белка только тогда, когда их образование необратимо

Стадийный механизм самоорганизации [20] предполагает, что выбор уникальной структуры белка из астрономического числа возможных происходит в несколько стадий: сначала выбирается вторичная структура; затем выбирается тип укладки уже сформированной вторичной структуры в глобулу; затем, в уже сформированной глобуле, устанавливаются мелкомасштабные детали: структура боковых групп и т.д. Фактически, он предполагает, что нативная структура белка находится под «кинетическим контролем».

Такой механизм привлекателен тем, что он дробит задачу выбора на части, каждая из которых может быть решена относительно быстро. Тут дело обстоит так же, как при наборе телефонного номера. Набирая свой номер, нужно выбрать (в Москве) одно семизначное число из  $\sim 10\,000\,000$  возможных. Однако эта задача решается быстро, так как нам не приходится просматривать все  $10\,000\,000$  номеров на гигантском телефонном диске. Вместо этого мы, пользуясь очень небольшим диском, на первом шаге мы выбираем одну цифру из 10, то же на втором шаге, и т.д. Итого — 7 выборов, каждый — из 10 возможностей:  $7 \times 10 = 70$  операций вместо  $10\,000\,000$ . Экономия времени громадная. Но за счет чего она достигается? За счет того, что каждый шаг набора номера необратим: набрав цифру телефонного номера, мы уже не меняем ее в дальнейшем.

Точно так же, вся экономия времени при стадийном (иерархическом) механизме самоорганизации достигается только при необратимости его стадий. Если выбранная вторичная структура навсегда фиксируется — время экономится. Если же белковая цепь выберет вторичную структуру и, столкнувшись потом с невозможностью ее упаковки в глобулу, опять вернется к выбору вторичной структуры — экономии времени не будет, так как вторичная структура при этом будет выбираться *только вместе* с упаковкой.

Но можем ли мы утверждать, что стадии самоорганизации белка необратимы? Иногда — да, но в общем случае — *нет*.

#### Самоорганизация белка наблюдается и при обратимости сворачивания

Любой процесс, физический или химический, происходит необратимо только тогда, когда конечное состояние много стабильнее исходного. Значит, необратимость стадий самоорганизации белка возможна только тогда, когда необратимо и сворачивание в целом, т.е. когда нативная структура белка намного (на много  $kT$ , т.е. на много ккал/моль) стабильнее его денатурированного состояния.

Однако самоорганизация белка *in vitro* наблюдается не только тогда, когда нативное состояние много стабильнее денатурированного (хотя именно таково положение дел при самоорганизации белка при физиологических условиях [32]). Оно наблюдается и тогда, когда нативное состояние лишь немного стабильнее денатурированного [13, 19, 21, 32, 33] (рис. 2).

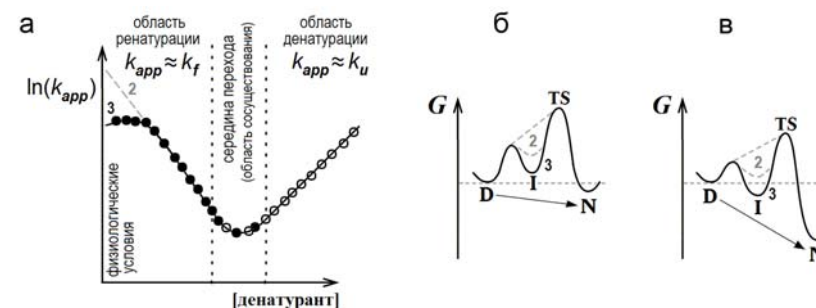


Рис. 2. (а) Типичный «шеvronный» график зависимости наблюдаемой скорости приближения к равновесию ( $k_{app}$ ) в процессе денатурации-ренатурации белка от концентрации денатуранта. Черные кружки соответствуют  $k_{app}$  при ренатурации предварительно денатурированного белка в ренатурирующих условиях (или в области середины перехода). Пустые кружки соответствуют  $k_{app}$  при денатурации, происходящей, когда нативный белок попадает в денатурирующие условия (или в область середины перехода). Видно, что сворачивание-разворачивание белка происходит без какого-либо гистерезиса: кружки обоих типов перекрываются вблизи середины перехода, где нативные (N) и денатурированные (D) состояния молекулы белка сосуществуют. В области ренатурации (где скорость ренатурации  $k_f$  много больше скорости денатурации  $k_u$ ) наблюдаемая скорость приближения к равновесию  $k_{app} \approx k_f$ . В области денатурации  $k_{app} \approx k_u$ , а  $k_f \approx k_u$ . В области середины перехода  $k_f \approx k_u \approx k_{app}/2$ . Кривая с кружками описывает поведение  $k_{app}$  для белка, имеющего 3 наблюдаемых состояния: N, D и интермедиат I. Пунктирное продолжение этой кривой в левой части графика описывает поведение  $k_{app}$  для белка, имеющего 2 наблюдаемых состояния: N и D. Вблизи середины перехода поведение  $k_{app}$  одинаково для белков обоих типов; различия наблюдаются лишь в условиях, приближающихся к физиологическим, где нативное состояние очень стабильно. Изменение свободной энергии  $G$  белковой молекулы вдоль пути сворачивания схематически показано на рисунке (б), относящемся к ренатурации, происходящей вблизи середины перехода, и на рисунке (в), относящемся к ренатурации при физиологических условиях. Черная кривая относится к белку, имеющему 3 состояния (у него метастабильный кинетический интермедиат I стабильнее исходного состояния D при физиологических условиях, но не вблизи середины перехода); серый пунктир относится к белкам, имеющим 2 состояния. У них метастабильный интермедиат I либо вовсе отсутствует (верхний пунктир), либо он, в принципе, есть, но всегда менее стабилен, чем D, и потому никак не наблюдается (нижний пунктир). Видно, что в последнем случае небольшое увеличение стабильности I может превратить белок с 2 наблюдаемыми состояниями в белок с 3 наблюдаемыми состояниями. Значком TS отмечено главное переходное состояние, лимитирующее скорость процесса. Адаптировано из [72].

### Самоорганизация белка наблюдается и при отсутствии интермедиатов сворачивания

Более того: самоорганизация белка наблюдается даже тогда, когда стабильности нативного и исходного денатурированного состояний практически совпадают (в самой области перехода, см. рис. 2). Здесь одновременно можно наблюдать и сворачивание, и разворачивание. При этом переход между денатурированным и нативным состояниями однодоменного белка всегда происходит как переход «все-или-ничего» [32], при котором не наблюдается никаких интермедиатов, а наблюдаются только два состояния белка: денатурированное (это может быть как неупорядоченный клубок, так и расплавленная глобула [34]) и нативное.

Таким образом, стадийный механизм самоорганизации может объяснить, почему самоорганизация белка идет быстрее в тех условиях, при которых нативный белок много стабильнее денатурированного (что действительно наблюдается, см. рис.2), но он не может решить «парадокс Левинталя» для общего случая, включающего самоорганизацию при почти равной стабильности нативного и исходного денатурированного состояний.

Более того: многие белки, в основном небольшие, всегда сворачиваются (причем — быстро сворачиваются!) вообще без каких-либо наблюдаемых интермедиатов [13, 28], и общая теория должна объяснить, как это происходит.

### ОБЩЕЕ РЕШЕНИЕ «ПАРАДОКСА ЛЕВИНТАЛЯ»

Парадокс Левинталя подчеркивает противоречие между «самой стабильной структурой» и «структурой, быстро сворачивающейся». Однако действительно ли существует такое противоречие? Может быть, стабильная структура *автоматически* обладает свойством сворачиваться быстро?

Компьютерные эксперименты по сворачиванию упрощенных моделей белков [35] подсказывали такой вывод, но сами по себе не могли объяснить его. Нужна была аналитическая теория кинетики самоорганизации.

Однако прежде чем рассматривать кинетику сворачивания белков, необходимо вспомнить ряд основополагающих фактов из области их термодинамики. Эти факты помогут нам понять, какие условия протекания процесса сворачивания мы должны рассматривать. Как и ранее, речь будет идти о небольших (однодоменных) водорастворимых глобулярных белках.

### Термодинамика де- и ренатурации белка

Итак, вот что говорит термодинамика:

1. Денатурация белка обратима, причем, как более 30 лет тому назад установил П.Л.Привалов (и что потом было подтверждено на масле однодоменных белков), она происходит как переход «все-или-ничего» [32, 36]. Последнее означает, что разворачивание («плавление») белка сходно с фазовым переходом первого рода (например, с плавлением кристалла), — то есть в ходе плавления только две формы белковой молекулы, нативная и денатурированная, присутствуют в заметных количествах, а «полусвернутые» и «неверно свернутые» формы практически отсутствуют.

2. Денатурированная форма белков, — во всяком случае, небольших белков, развернутых сильным денатурантом типа мочевины, — часто является полностью развернутым, неупорядоченным и сильно флуктуирующим состоянием цепи (которое обычно называется «клубком») [19].

3. Даже при нормальных физиологических условиях нативная форма белка часто не намного стабильнее его развернутой формы (а в точке плавления, где наблюдается как сворачивание, так и разворачивание, обе эти формы, естественно, одинаково стабильны) [19, 32]. При этом нативная структура белка стабильна благодаря скрепляющим ее взаимодействиям, то есть благодаря своей низкой энергии, а его развернутая форма — благодаря огромному числу разных развернутых конфигураций цепи, то есть благодаря своей высокой энтропии\*.

4. Переход «все-или-ничего» возможен только в цепях, аминокислотная последовательность которых обеспечивает достаточно большую энергетическую щель между основной массой структур и самой стабильной структурой цепи (рис. 3).

Последний параграф нуждается в пояснении, так как изложенный в нем результат следует не из непосредственного опыта (экспериментальное измерение «энергетической щели» стоит на повестке дня), а из физической теории, описывающей термодинамику «случайных»

\* Если молекулы растворителя не рассматриваются в явном (молекулярном) виде, в литературе по самоорганизации белков термином «энергия» принято обозначать сумму энергии взаимодействий в белковой цепи и свободной энергии ее взаимодействий с растворителем (хотя последняя часто определяется энтропией, т.е. числом возможных конфигураций контактирующих с белком молекул растворителя; так обстоит дело, например, в случае гидрофобных взаимодействий, вызывающих слипание неполярных молекул масла в капли, а обогащенной неполярными аминокислотами белковой цепи — в глобулу). Термин же «энтропия» при этом охватывает лишь конфигурационную энтропию цепи, но не энтропию растворителя.

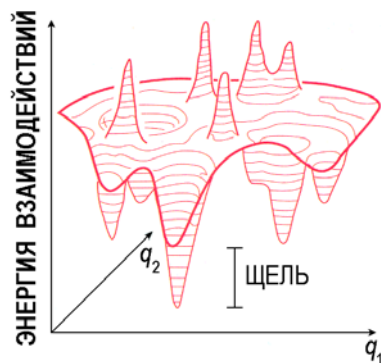


Рис. 3. Схематическое изображение энергетического ландшафта белковой цепи: впадины (минимумы энергии) соответствуют тем конфигурациям цепи, в которых ее звенья сильно притягиваются, холмы — тем, где ее звенья сильно отталкиваются.

На рисунке мы можем изобразить только две координаты ( $q_1$  и  $q_2$ ), описывающие конфигурацию цепи, тогда как реальная конфигурация белковой цепи (см. рис. 1) описывается сотнями координат.

Широкая энергетическая щель между глобальным и прочими энергетическими минимумами характерна не для всех, а только для «отобранных», «белковоподобных» аминокислотных последовательностей. Эта щель необходима для того, чтобы стабильная укладка цепи разрушалась бы только путем термодинамического перехода типа «все-или-ничего»; это, в свою очередь, обеспечивает надежную — по принципу «все-или-ничего», как у электрической лампочки — работу белка.

и «отобранных» гетерополимеров. Эта теория, подробный рассказ о которой увел бы нас слишком далеко, была развита на грани 1980-х — 90-х гг. [37–45]. Она позволяет оценить долю годных для создания белков аминокислотных последовательностей, связать наличие часто и редко встречающихся в белках пространственных структур с их формой и т.д. [4]. И хотя эта теория не описывает кинетику структурных превращений гетерополимеров, из нее следует важный для кинетики вывод, заключающийся в следующем. Большинство случайных гетерополимеров имеет непрерывный энергетический спектр, и поэтому они затвердевают постепенно (как стекло). Однако некоторые из гетерополимеров «случайно» обладают повышенной корреляцией взаимодействий разных звеньев цепи в какой-то из глобулярных укладок; это повышает стабильность такой укладки и создает «энергетическую щель» между нею и прочими укладками цепи такого «случайно отобранного» гетерополимера.

Эта единственная особенность, «энергетическая щель», приводит к существованию у «отобранных» гетерополимеров обеих основных физических особенностей белков: к наличию индивидуальной стабильной пространственной структуры и к ее плавлению путем резкого фазового перехода первого рода. А так как именно эти особенности необходимы для того, чтобы белок не только имел бы специфическую функцию, но и до какого-

то предела «терпел» бы, не меняясь, изменения среды, — то такая щель, очень нужная для надежной работы белка, должна поддерживаться естественным отбором.

### Скорость образования самой стабильной структуры

Итак, изучая кинетику самоорганизации белка, мы должны рассмотреть скорость образования самой стабильной укладки цепи с «отобранной» аминокислотной последовательностью, обеспечивающей наличие «щели» между энергией этой «самой стабильной» укладки цепи и энергиями всех прочих ее укладок [46–48]. Причем мы можем рассматривать самоорганизацию такой цепи вблизи точки денатурации, т.е. когда ее самая стабильная структура лишь чуть более стабильна, чем клубок, а все прочие состояния этой цепи, претерпевающей переход «все-или-ничего», термодинамически неустойчивы. Интермедиаты сворачивания («расплавленные» и «пред-расплавленные» глобулы) могут появиться лишь при удалении от точки перехода «все-или-ничего» между «самой стабильной» белковой глобулой и клубком, когда эта глобула становится много стабильнее развернутого состояния цепи. Опыт показывает, что при этом сворачивание белка ускоряется; но его теоретический анализ делается сложным\*. Поэтому мы ограничимся окрестностью точки денатурации, где белок сворачивается пусть не максимально быстро, но зато максимально просто. Наша цель — доказать, что при этом самая стабильная пространственная структура цепи с «отобранной» (как у белка) аминокислотной последовательностью сворачивается за биологически разумное время — секунды или минуты.

Для того чтобы доказать, что стабильная структура сворачивается быстро, достаточно показать, что к ней ведет по крайней мере один «быстрый» путь сворачивания.

Наличие не одного, а многих путей сворачивания «самой стабильной» структуры может только ускорить процесс. А вот путей сворачивания не самой стабильной, а прочих (и, значит, при наличии «щели» — высокоэнергетичных) структур мы можем не рассматривать вовсе! Они не могут сбить нашу цепь с пути истинного. Ведь вблизи точки перехода «все-или-ничего» между самой стабильной структурой цепи

\*Аналитическая теория самоорганизации белка, у которого стабильность нативной структуры существенно превосходит стабильность денатурированного состояния, развита Д. Тирумалаи [49]. Согласно теории Тирумалаи, время самоорганизации белка пропорционально длине его цепи в степени  $1/2$ , что, на качественном уровне, согласуется с результатами излагаемой здесь теории, согласно которой время самоорганизации белка пропорционально длине его цепи в степени  $2/3$ .

и клубком *никакие* «полу-» и «неверно свернутые» и «расплавленные» состояния не могут служить ловушками: они не могут «впитать» сворачивающиеся цепи просто в силу малости своей суммарной стабильности. Полезная аналогия здесь — просачивание воды через трещины в стенке, разделяющей два бассейна: если «емкость» трещин мала, т.е. они не способны впитать всю воду, то каждая новая трещина в стенке может только ускорить наполнение второго бассейна. Поэтому, рассмотрев просачивание воды через одну трещину, мы оценим минимальную скорость его наполнения.

Путь сворачивания проходит быстро, если быстро делается каждый шаг на этом пути, если шагов нужно сделать не слишком много, и (главное!) если этот путь не преграждает «барьер» высокой свободной энергии на одной из стадий сворачивания. Напомню, что «свободная энергия» включает в себя не только энергию, но и энтропию, и свободная энергия тем выше, чем ниже энтропия, т.е. чем меньше число возможных конфигураций (в нашем случае — чем меньше конфигураций цепи, соответствующих переваливанию через барьер, тем труднее на этот перевал попасть).

Судя по измеренной скорости роста  $\alpha$ -спиралей, важнейших элементов белковых глобул, характерное время одного шага процесса сворачивания, т.е. время фиксации структуры одного звена белковой цепи, составляет всего лишь  $\sim 10$  нс [50]. Поэтому белок, фиксируя одно свое звено за другим, сворачивался бы мгновенно (100-звенная цепь делала бы необходимые 100 шагов за  $\sim 1000$  нс), *если бы* сворачивание цепи не должно было бы преодолевать свободно-энергетический барьер.

Отметим, что как наблюдаемое сосуществование процессов сворачивания и разворачивания белка в точке денатурации [13, 32], так и «не-мгновенность» этих процессов прямо указывают, что сворачивающийся белок не просто движется «под уклон» по свободной энергии, но преодолевает какой-то барьер.

Когда есть барьер, скорость перехода через него оценивают, исходя из классической теории переходного (или активированного) состояния [51]:

$$\text{скорость} \sim k_0 \times \exp(-\Delta G^\ddagger/RT). \quad (1)$$

Здесь  $k_0$  — скорость одного шага процесса (в нашем случае — скорость фиксации одного звена цепи,  $0,1 \text{ нс}^{-1}$ ),  $T$  — абсолютная температура,  $R$  — газовая постоянная, а  $\Delta G^\ddagger$  — высота максимума свободной энергии на пути процесса («переходного состояния») относительно свободной энергии исходного состояния (в нашем случае — клубкового состояния цепи). Смысл формулы (1) очень прост. Вели-

чина  $\exp(\Delta G^\ddagger/RT)$  — термодинамическая вероятность попадания из начального в «переходное», самое «невероятное» по ходу процесса состояние (после которого процесс идет с понижением свободной энергии, т.е. «под уклон», и потому очень быстро). Малая вероятность находится на высоком свободно-энергетическом барьере и замедляет процесс. При этом каждая молекула затрачивает основное время не на продвижение по пути сворачивания, а на вызванные тепловыми флуктуациями попытки преодолеть барьер, падения с него назад, в исходное состояние, новые попытки и т.д.

Итак, нам нужно лишь оценить величину  $\Delta G^\ddagger$  на каком-то разумном пути сворачивания, ведущем к самой стабильной структуре. Поначалу кажется, что найти такой путь очень сложно. Однако на самом деле это не так.

В самом деле, разумный путь *разворачивания* каждой структуры найти просто (например, можно последовательно оплавливать глобулу с одного конца, см. рис. 4). А путь разворачивания, пройденный в обратную сторону, есть (согласно хорошо известному в физике «принципу детального равновесия») возможный путь сворачивания.

Посмотрим, как меняется свободная энергия на таком пути — пути, состоящем в переходе звеньев цепи с поверхности клубка на поверхность глобулы и не затрагивающем ее твердую внутренность, где все перестройки были бы очень медленными.

Сворачивание цепи ведет к падению и энтропии (ведь цепь упорядочивается) и энергии (так как между сближающимися звеньями цепи образуются контакты). Падение энтропии повышает, а падение энергии понижает свободную энергию.

В основе парадокса Левинталя лежит предположение, что цепь должна очень близко подойти к своей конечной структуре перед тем, как начнут возникать стабилизирующие эту структуру контакты, т.е. картина проигрыша всей энтропии цепи *до* начала выигрыша энергии. Тогда, действительно, рост свободной энергии вначале (пока не начнется выигрыш энергии) будет огромным, пропорциональным числу звеньев  $L$  белковой цепи, а образование самой стабильной структуры, согласно формуле (1), — бесконечно медленным, пропорциональным  $\exp(L)$ .

Напротив, если путь сворачивания таков, что на нем падение энтропии почти тут же компенсируется падением энергии [52], то барьер на этом пути невысок, и самоорганизация идет быстро.

Именно такая ситуация возникает на изображенном на рис. 4 пути последовательного сворачивания (т.е. на рассмотренном в противоположном направлении пути последовательного разворачивания глобулы). Если обе фазы белковой цепи, глобулярная и развернутая,

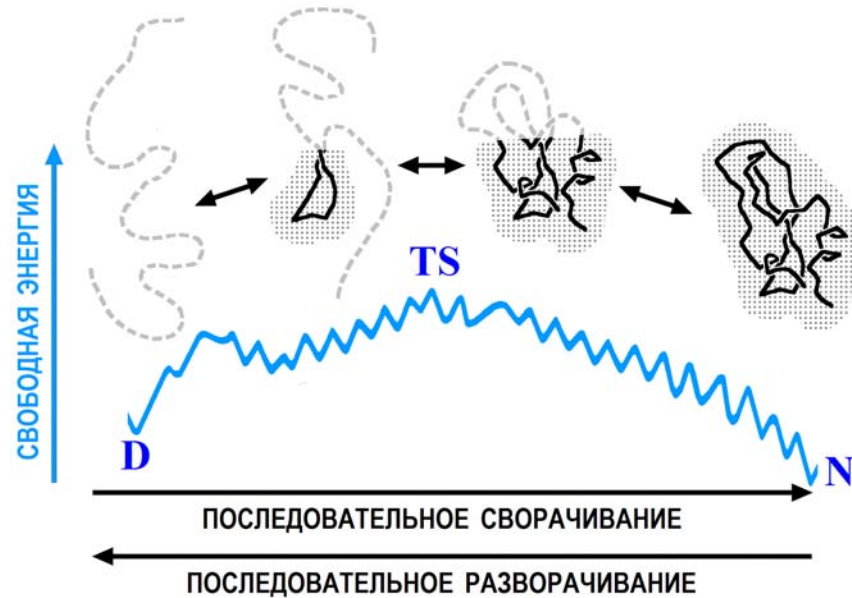


Рис.4. Схематическое изображение одного из возможных путей последовательного сворачивания и разворачивания белка (сворачивания, если проследить путь слева направо; разворачивания, если проследить его справа налево) при переходе типа «все-или-ничего» (см. рис. 2б). На этом пути происходит разделение «нативной» и «клубковой» фаз.

Пунктиром показана цепь, остающаяся в неупорядоченном, развернутом состоянии — «клубке». Выделенная точками область отвечает обретенной своей финальной структуре части белка. Жирной линией выделена главная цепь уже свернувшейся части глобулы; боковые группы не показаны для упрощения рисунка. Волнистой линией показано изменение свободной энергии по ходу процесса. Свободная энергия минимальна для двух стабильных состояний цепи (полностью развернутого и полностью свернутого, крайних на рисунке) и максимальна для «переходного», т.е. нестабильного «полусвернутого» состояния, помеченного значком TS. Ухабы на серой линии отражают преодоление холмов и впадин энергетического ландшафта (см. рис. 3).

имеют одинаковую стабильность (не зря мы, для простоты, рассматриваем точку денатурации!), то вся избыточная свободная энергия  $\Delta G^\#$  «полусвернутой» глобулы (рис. 5) связана только с поверхностью раздела этих фаз. А максимальный размер этой поверхности, если структурированная часть полусвернутой глобулы компактна, пропорционален не числу звеньев цепи ( $L$ ), а всего лишь  $L^{2/3}$ . (Пояснение. Объем плотного тела из  $L$  частиц примерно одинакового размера пропорционален  $L$ , его диаметр пропорционален  $L^{1/3}$ , а площадь сечения пропорциональна  $L^{2/3}$ ).

Рис. 5. Полусвернутая глобула; пунктиром изображены неупорядоченные замкнутые петли, торчащие из ее поверхности. Вся избыточная свободная энергия полусвернутой глобулы, делающая ее нестабильной, связана с поверхностью раздела между фиксированной (глобулярной) и неупорядоченной (клубковой) частями белка. Размер этой поверхности у компактной части полусвернутой глобулы пропорционален числу звеньев в цепи в степени  $2/3$ , т.е.  $L^{2/3}$ .



«Переходное» состояние отвечает максимуму свободной энергии [13], т.е., в нашем случае, максимальному размеру поверхности раздела глобулярной и клубковой фаз на пути сворачивания. Соответственно, глобулярная часть этого переходного состояния, «ядро сворачивания», охватывает примерно половину белка (кстати, такой большой размер ядра исключает предположение о том, что важных и при том принципиально разных путей сворачивания может быть очень много). Однако обстоятельный рассказ об этих «ядрах», открытых и экспериментально исследуемых в работах А. Фершта и его последователей [13], уместно отложить до главы IV.

Избыточная свободная энергия  $\Delta G^\#$  поверхности раздела фаз складывается из:

1. Повышающего энергию дефицита контактов у поверхностных звеньев глобулярной фазы (он составляет, в расчете на поверхностный аминокислотный остаток, около 30% энергии взаимодействий этого остатка внутри глобулы; исходя из экспериментальных данных по термодинамике белков [32], можно показать, что такая добавочная энергия полусвернутой глобулы составляет, в максимуме, около  $\frac{1}{2}L^{2/3}RT_0$  [46, 47], где  $T_0$  — температура, при которой происходит денатурация белка);

2. Дефицита энтропии клубковой фазы, возникающей из-за фиксации концов замкнутых петель, торчащих из поверхности полусвернутой глобулы (рис. 5). Если пространственная структура белка такова, что любая проходящая через его середину поверхность раздела фаз будет плотно уставлена петлями, то эта добавочная свободная энергия максимальна и, как можно показать (оценив эту энтропию по Флори [53], а ожидаемое распределение петель по длинам по [54]), она составляет около  $L^{2/3}RT_0$  [46–48]. Однако эта «энтропийная» составляющая исчезает, если структура данного белка позволяет провести раздел фаз без образования замкнутых неупорядоченных петель, исходящих из поверхности раздела.

Итак,  $\Delta G^\# / RT_0$  лежит в пределах от  $\frac{1}{2}L^{2/3}$  до  $\frac{3}{2}L^{2/3}$ , а ее конкретная величина (которую мы рассмотрим в следующей главе) зависит от архитектуры белка.

Соответственно уравнению (1) и сделанной выше оценке величины  $\Delta G^\# / RT_0$ , для возникновения самой стабильной структуры белковой цепи из клубка (в точке денатурации) характерна

$$\text{скорость} \sim \text{от} [\exp(-\frac{1}{2} L^{2/3}) \times 10^8 \text{ с}^{-1}] \text{ до} [\exp(-\frac{3}{2} L^{2/3}) \times 10^8 \text{ с}^{-1}]. \quad (2)$$

Интересно, что «затравки», — химические неоднородности, столь важные для кинетики фазовых переходов в обычных «макроскопических» системах (например, при кристаллизации или кипении), играют, видимо, лишь второстепенную роль в кинетике самоорганизации белка. Согласно теоретическим оценкам [46, 47], их вклад в величину  $\Delta G^\# / RT_0$  в типичном случае составляет лишь  $\sim L^{1/2}$ , то есть он невелик по сравнению с  $L^{2/3}$ .

#### *Обсуждение некоторых качественных выводов из общей теории*

Даваемая уравнением (2) оценка времени самоорганизации показывает, что цепь из  $\sim 100$  звеньев должна принимать свою самую стабильную структуру, в зависимости от ее формы, за миллисекунды или часы (но вовсе не за время жизни Вселенной!).

Уравнение (2) описывает скорость самоорганизации белка при переходе из рыхлого неупорядоченного клубка в нативную глобулу. Однако, в своих основных чертах, оно применимо и к самоорганизации, стартующей от расплавленной глобулы. В любом случае скорость сворачивания должна лимитироваться эффектами, возникающими на поверхности нативной фазы, и поэтому она должна падать с увеличением белковой цепи как  $\exp(-AL^{2/3})$  вблизи середины перехода расплавленная глобула  $\leftrightarrow$  нативная структура. Правда, теоретически оценить величину коэффициента  $A$  (или пределы его вариации) до сих пор не удалось. Однако отсутствие многопорядковых различий скорости самоорганизации белков, самоорганизующихся, стартуя от разных состояний белковой цепи, показывает, что  $A \sim 1$ .

Это же уравнение (2) объясняет, почему большие белки состоят (согласно старому принципу «разделяй и властвуй») из отдельно сворачивающихся стабильных доменов, охватывающих обычно около 100–200 остатков каждый. Если бы большой белок не состоял из доменов, а должен был бы свернуться в единую большую глобулу, то не мог бы сделать это за разумное время (и, скорее всего, агрегировал бы). А вот когда он состоит из небольших, внутренне стабильных доменов, а рибосома синтезирует белковую цепь, постепенно выдавая домен за доменом, и шапероны защищают эту цепь от агрегации, то большой белок может самоорганизовываться подоменно, причем достаточно быстро.

Следующий и также совпадающий с опытом вывод из описанной выше теории состоит в том, что при небольшой стабилизации нативной структуры (например, при понижении температуры или при уменьшении концентрации денатуранта в растворе, см. рис. 2) скорость самоорганизации увеличивается: ведь при этом растет стабильность (точнее, падает нестабильность) и переходного состояния. Можно показать [46], что увеличение стабильности нативной структуры (по сравнению с денатурированным состоянием) на 1 ккал/моль понижает свободную энергию переходного состояния примерно на  $\frac{1}{2}$  ккал/моль (ведь «ядро сворачивания» охватывает примерно половину белка) и, соответственно, ускоряет сворачивание раза в два-три.

Однако этот рост продолжается лишь до тех пор, пока «неверно свернутые» глобулы остаются менее стабильными, чем клубок. Дальнейший же рост стабильности глобул уже мало ускоряет (см. рис. 2) самоорганизацию белка, так как он приводит к появлению метастабильных «глобул-ловушек», способных удержать цепь и замедлить даже ее попадание в нативную структуру. Причем «ловушки» должны появляться с ростом стабильности нативной структуры белка тем раньше, чем меньше энергетическая щель между нативной структурой и прочими укладками цепи. Это еще раз подчеркивает, что действительно быстро находить свою стабильную нативную структуру может только такая цепь, у которой энергия нативной структуры отделена достаточно большой щелью от энергий структур, конкурирующих с нативной.

Здесь у внимательного читателя естественно возникает вопрос — что будет, если у цепи не одна структура отделена от прочих большой энергетической щелью, а, скажем, две?

Ответ таков: если обе эти структуры стабильны по сравнению с развернутым состоянием цепи, первой из них свернется та, к которой идет лучший (с немного более низким барьером) путь сворачивания. Однако, если эта структура хоть немного менее стабильна, чем другая, последует очень медленный (так как придется разворачивать стабильную структуру) переход в более стабильную форму. Этот переход похож на полиморфные переходы в кристаллах (вспомним «оловянную болезнь» — переход белого олова в серое: эта «болезнь» порой уничтожала, при наступлении холодов, целые склады оловянных пуговиц). По-видимому, таких «полиморфных» белков должно быть мало (теоретические оценки показывают, что если аминокислотные последовательности, кодирующие одну стабильную укладку цепи, довольно редки, то последовательности, кодирующие сразу две такие укладки, редки в квадрате [4, 55]). Однако есть основания полагать, что некоторые белки — например, серпины — ведут себя именно так [56]. Сходным, в некотором смысле, образом ведут себя прионы и другие ами-

лоидогенные белки [57, 58]. Правда, в этом случае полиморфизм осложнен слипанием белков в фибриллы, которому способствует — или которым наводится — другая,  $\beta$ -структурная форма белка. Когда в инициации процесса самоорганизации участвует не одна, а несколько белковых цепей, растет число  $L$  звеньев в единице самоорганизации, что, по сделанным выше оценкам, делает зарождение новой фазы очень медленным. Но зато раз возникший зародыш новой формы белка быстро переводит в новую форму и втягивает в агрегат (амилоид) другие белковые молекулы (по существу — так же, как при «оловянной чуме»). Именно эта  $\beta$ -структурная агрегация прионов и других амилоидогенных белков в клетках мозга и других органов и приводит, в конце концов, к летальному исходу при «коровьем бешенстве», почечухе, старческом маразме и родственных им болезнях с огромным инкубационным периодом [58].

Впрочем, есть и более простой, «мирный» и хорошо изученный лабораторный пример того же рода: водорастворимый аминокислотный полимер поли(лизин) в пробирке, при  $pH > 10$  и температуре 20–40 °С, мгновенно переходит из клубка в  $\alpha$ -спираль, а потом — гораздо медленнее — из  $\alpha$ -спирали в  $\beta$ -структуру [59]. Последний переход, обычно сопровождаемый агрегацией, может занимать часы, недели и более — его время катастрофически растет с падением стабильности  $\beta$ -структуры относительно «не  $\beta$ -структурного» состояния цепи [60, 61].

### III. ОЦЕНКА СКОРОСТИ СВОРАЧИВАНИЯ БЕЛКА ПО ЕГО ТРЕТИЧНОЙ, ВТОРИЧНОЙ И ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЕ

Оценка диапазона скоростей сворачивания, даваемая уравнением (2), была нацелена на принципиальное решение «парадокса Левинталя», а не на расчет скоростей сворачивания конкретных белков. Она была получена тогда, когда данных по скоростям сворачивания белков было еще мало. Однако эта оценка находится в неплохом согласии с экспериментальными измерениями скоростей сворачивания, проведенными, к настоящему времени, для многих десятков белков (рис. 6). Эти измерения охватывают белки, имеющие разные механизмы самоорганизации, различающиеся в 15 раз по размеру и во много миллиардов раз — по скорости сворачивания.

Однако из того же рисунка видно, что скорости сворачивания белков примерно одного и того же размера могут иногда различаться в миллионы раз. В результате корреляция наблюдаемых скоростей логарифмов сворачивания с величиной  $-L^{2/3}$  (где  $L$  — число аминокислотных остатков в цепи) не очень высока, около 65%.

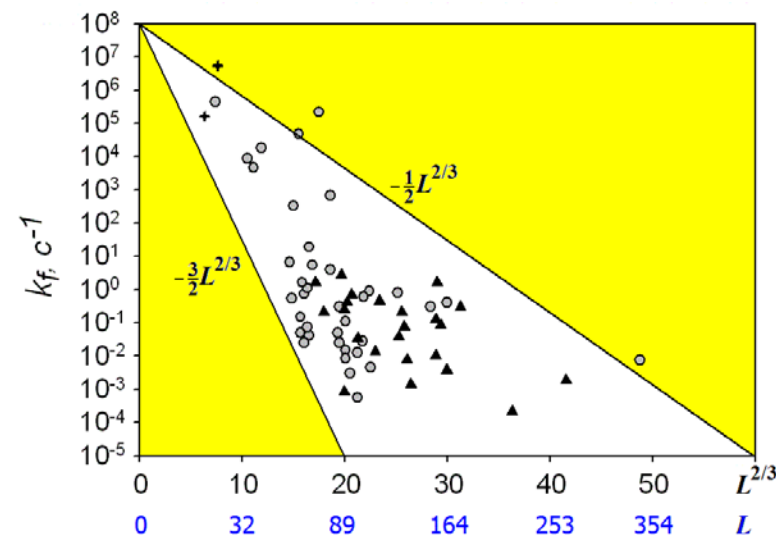


Рис. 6. Зависимость представленной в логарифмической шкале скорости перехода из денатурированного состояния в нативное (в точке их термодинамического равновесия) от числа  $L^{2/3}$ , где  $L$  — число аминокислотных остатков в цепи.

Кружки относятся к белкам, сворачивающимся без видимых интермедиатов во всем диапазоне экспериментальных условий; треугольники — к тем, для которых интермедиаты наблюдаются (но — вдали от середины перехода, ближе к «физиологическим» условиям). Все эти белки не имеют S–S связей и не требуют лигандов для своей самоорганизации. Символы + относятся к сворачиванию отдельной  $\alpha$ -спирали и отдельной  $\beta$ -шпильки. Линии « $-1/2 L^{2/3}$ » и « $-3/2 L^{2/3}$ », сходящиеся на уровне  $10^8 \text{ s}^{-1}$  (соответствующем экспериментально измеренной скорости приращения  $\alpha$ -спирали на один аминокислотный остаток), ограничивают теоретически оцененный (см. формулу (2)) диапазон скоростей самоорганизации в точке термодинамического равновесия клубка с нативной структурой; на рисунке этот диапазон выделен белым цветом. Адаптировано из [4] с добавлением всех последних данных, собранных в [64, 65].

Плакско, Симонс и Бейкер исследовали многопорядковую разницу скоростей самоорганизации небольших белков, сворачивающихся по одному и тому же механизму «двух состояний» (т.е. без наблюдаемых интермедиатов) [62]. Они пришли к выводу, что наблюдаемые различия в логарифмах скоростей сворачивания этих белков в воде хорошо (на уровне 85%) коррелируют с введенным ими «контактным порядком»

$$CO = \frac{1}{L \cdot N} \sum_N \Delta L_{ij}, \quad (3)$$

где  $N$  — число межатомных контактов в белке,  $\Delta L_{ij}$  — число аминокислотных остатков, разделяющих в цепи контактирующие атомы, а  $L$  — число аминокислотных остатков в цепи.

«Контактный порядок» отражает устройство белка: он мал для просто устроенных белков, где массово контактируют между собой близкие по цепи остатки (это, в основном,  $\alpha$ -спиральные белки), и велик для белков, где массово контактируют между собой далекие по цепи остатки (это, в основном, белки со сложной  $\beta$ -структурной топологией).

Правда, «контактный порядок» отлично работал только для близких по размеру белков, сворачивающихся по механизму «двух состояний», и совершенно не коррелировал с опытом ни для более крупных белков, сворачивающихся по механизму «трех состояний» (т.е. с наблюдаемыми интермедиатами), ни для мелких пептидов [63].

По своему физическому смыслу, «контактный порядок»  $CO$  близок к коэффициенту  $1/2 + 3/2$  в формуле (2), который мы, не задаваясь конкретной структурой белка, могли только оценить снизу и сверху. В самом деле,  $CO$  связан с петлями, образованными белковой цепью в нативной глобуле, а коэффициент  $1/2 + 3/2$  — с петлями, торчащими из «полусвернутой» глобулы. Поэтому было естественно «скрестить» теорию Плакско-Бейкера [62], учитывающую только форму белка и хорошо описывающую скорости сворачивания небольших белков, «имеющих два состояния» (но только таких белков), с нашей теорией [47], учитывающей, прежде всего, размер белка и описывающей (хотя и довольно грубо) скорости сворачивания всех белков.

В результате этой совместной работы [64] было показано, что логарифмы скоростей сворачивания *всех* белков в воде неплохо (на уровне 75%) коррелируют с величиной

$$Abs\_CO = CO \times L = \frac{1}{N} \sum \Delta L_{ij}, \quad (4)$$

причем величина  $Abs\_CO$  растет с ростом длины белковой цепи  $L$ , в среднем, как  $L^{2/3 \pm 0.3}$  (в то время как  $CO$  падает с ростом  $L$  как  $L^{-1/3}$  в среднем). При этом выяснилось, что новая теория [64] не только лучше, чем обе ее предшественницы, описывает экспериментальные данные по всем белкам в целом и по белкам, имеющим интермедиаты сворачивания (т.е. «имеющим три состояния») в частности. Уже после опубликования новой теории стало известно о быстро сворачивающихся маленьких белках с большим  $CO$  (которые, по исходной теории Плакско-Бейкера [62], должны сворачиваться медленно) и о медленно сворачивающихся больших (но не имеющих интермедиатов сворачивания) белках с малым  $CO$  (которые, по [62], должны сворачиваться

быстро). Эти данные (см. вспомогательные материалы к [65]) показали, что новая теория [64], учитывающая и «контактный порядок», и размер белка, несколько лучше, чем [62], описывает скорости сворачивания даже тех белков, что не имеют интермедиатов сворачивания.

Так была получена теория, способная неплохо (корреляция с опытом — 75%) предсказывать скорости сворачивания белков по их пространственной структуре.

Более того: так как величина «контактного порядка» тесно связана с содержанием  $\alpha$ -структуры в белке [67], — стало ясно, что предсказывать скорости сворачивания белков и пептидов можно по их вторичной структуре и длине цепи, и даже не зная пространственной структуры. Было предположено, что  $\alpha$ -спирали могут служить блоками самоорганизации, и что, следовательно, скорость сворачивания должна определяться просто суммарной длиной  $L_{эфф}$  неспиральных участков белковой цепи, — и это предположение подтвердилось [65].

А так как вторичную структуру белка можно неплохо предсказывать по его первичной структуре (например, известной программой PsiPred [66]) стало возможным предсказывать скорости сворачивания белков (и пептидов) *только* по их аминокислотной последовательности [65] (рис. 7), — и причем корреляция теории с опытом превышает 80% на всем массиве белков, скорость сворачивания которых измерена.

Правда, оказалось, что наивысшая корреляция наблюдаемых скоростей сворачивания наблюдается не с  $(L_{эфф})^{2/3}$  (что согласовалось бы с общей теорией [47]), а с  $\ln(L_{эфф})$ . И хотя различия корреляции эксперимента с  $(L_{эфф})^{2/3}$  и  $\ln(L_{эфф})$  находятся в пределах статистической погрешности (см. врезку в рис. 7), «победа»  $\ln(L_{эфф})$  создает у нас некий дискомфорт и показывает, что теория скоростей сворачивания белков нуждается в дальнейшем развитии.

#### IV. ЯДРО СВОРАЧИВАНИЯ БЕЛКОВОЙ ГЛОБУЛЫ

##### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЯДЕР СВОРАЧИВАНИЯ

Ядро сворачивания — глобулярная часть переходного состояния, играющего ключевую роль в кинетике процесса сворачивания и своей нестабильностью определяющего его скорость [13, 68].

Надо подчеркнуть, что переходное состояние является, по определению, *самым нестабильным* состоянием на пути сворачивания. Таким образом, это — *не* какой-то из «интермедиатов сворачивания», о которых шла речь выше. Те соответствуют минимумам свободной энергии; поэтому они стабильны хотя бы в течение какого-то вре-

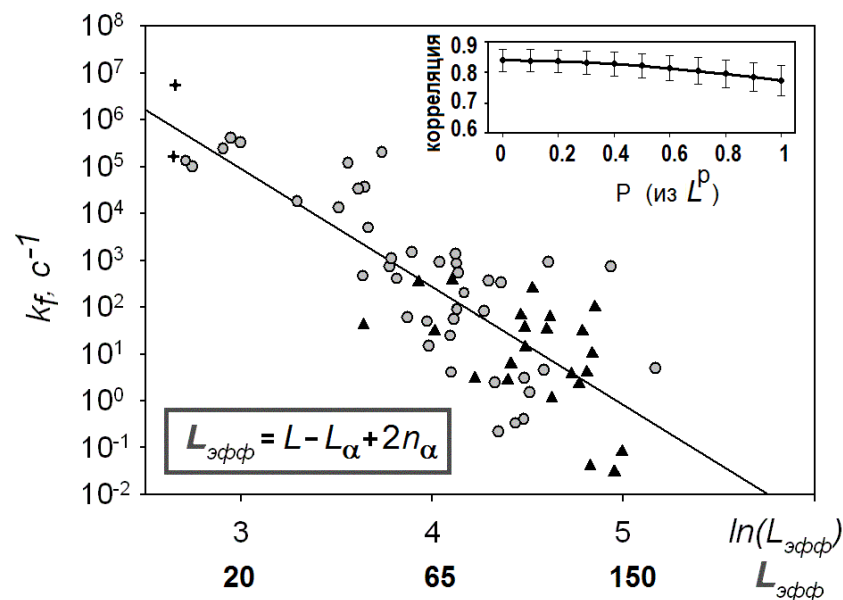


Рис. 7. Корреляция представленной в логарифмической шкале наблюдаемой скорости сворачивания ( $k_f$ ) с рассчитанной по первичной структуре белка величиной  $\ln(L_{\text{эфф}})$ . Величина  $L_{\text{эфф}}$  равна числу аминокислотных остатков в цепи ( $L$ ) за вычетом общей длины  $\alpha$ -спиралей в нем ( $L_\alpha$ ) и суммарной длины иницирующих эти  $n_\alpha$  спиралей витков ( $2n_\alpha$ ). Величины  $L_\alpha$  и  $n_\alpha$  предсказываются по первичной структуре белка программой PsiPred [66].

Условные значки — те же, что на рис. 6. На врезке: корреляция  $\ln(k_f)$  и  $(L_{\text{эфф}})^P$ ; указаны статистические погрешности. Точка  $P=0$  отвечает корреляции с  $\ln(L_{\text{эфф}})$ , так как  $(L)^{P \rightarrow 0} \rightarrow 1 + P \times \ln(L)$ .

мени, то есть они могут накапливаться в процессе сворачивания, и их можно наблюдать непосредственно. Наоборот, переходное состояние соответствует максимуму свободной энергии; поэтому оно не накапливается и не наблюдается непосредственно. Его можно наблюдать только по его влиянию на скорость сворачивания.

Природу переходного состояния удалось выяснить с помощью белковой инженерии. Применяя множество мутаций и анализируя соответствующие им изменения в шевронных графиках (рис. 8), удастся — ценой колоссального труда — узнать, какие именно остатки вовлечены в «нативоподобное» переходное состояние, т.е. в ядро сворачивания (их мутации существенно влияют на скорость сворачивания), а какие — нет (рис. 9). Этот метод был разработан А. Ферштом и его сотрудниками [13].

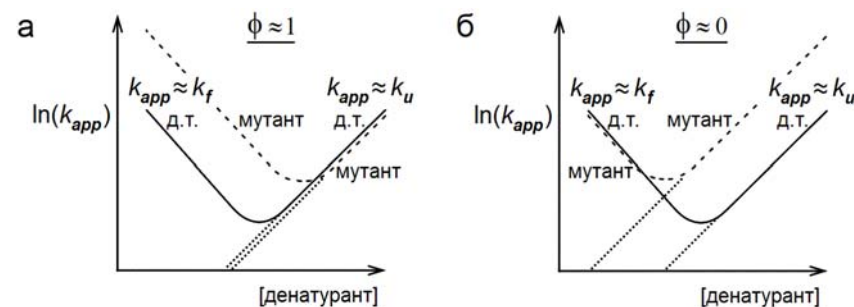
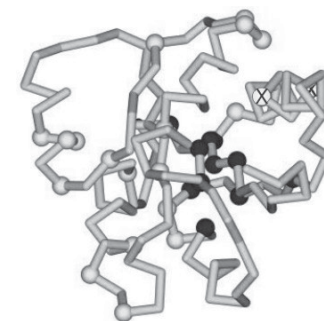


Рис. 8. Схема определения остатков белковой цепи, входящих (а) и не входящих (б) в ядро сворачивания белка по результатам направленного мутагенеза этих остатков.

Мутация входящего в ядро сворачивания остатка меняет скорость сворачивания ( $k_f$ ), а не входящего — скорость разворачивания ( $k_u$ ), что проявляется в соответствующем смещении шевронного графика (см. рис. 2) мутантного белка относительно шевронного графика белка «дикого типа» (д.т.), т.е. немутированного. Соотношение сдвигов ветвей шеврона, соответствующих сворачиванию и разворачиванию, определяет величину  $\phi$  (см. текст и уравнение (4));  $\phi$  близка к 1 для остатков, входящих в ядро сворачивания, и к 0 для остатков, не входящих в это ядро. Необходимые для « $\phi$ -анализа» экстраполяции величин на область сворачивания показаны точечными линиями.

Рис. 9. Экспериментально очерченное ядро сворачивания белка CheY, согласно [74].

Входящие в ядро сворачивания остатки изображены черными шариками на фоне нативной укладки цепи. Светлыми шариками изображены не вовлеченные в ядро сворачивания остатки. Без шариков оставлены те области цепи, где мутации еще не делались. Крестами помечены два сложных для экспериментальной интерпретации (из-за малых сдвигов шевронных графиков соответствующих мутантов) остатка цепи.



Участие остатка  $i$  в ядре сворачивания определяется величиной

$$\phi_i = \Delta_i \ln k_f / \Delta_i \ln K. \quad (4)$$

Здесь  $k_f$  — скорость сворачивания,  $K = k_f/k_u$  — константа равновесия между нативным и развернутым состоянием белка (причем  $k_u$  — экстраполированная на область сворачивания скорость разворачи-

вания), а  $\Delta_i$  означает сдвиг соответствующих величин под воздействием мутации в рассматриваемом остатке  $i$ . Согласно модели «нативоподобного ядра сворачивания» [68, 69],  $\phi_i = 1$  означает, что и конформация остатка  $i$ , и его окружение — те же в переходном состоянии TS, что в нативном белке (т.е. что этот остаток находится внутри ядра сворачивания);  $\phi_i = 0$  означает, что этот остаток находится в развернутой цепи в TS. Свидетельства величин  $\phi_i \approx 0,5$  (встречающихся на практике очень часто), вообще говоря, неоднозначны: остаток находится либо на поверхности ядра сворачивания, либо в одном из альтернативных ядер. Достойно внимания то, что величины  $\phi < 0$  и  $\phi > 1$  (несовместимые с моделью нативоподобного ядра сворачивания) редки и практически никогда не встречаются у остатков с надежно измеренными величинами  $\Delta \ln K$ . Это подтверждает модель нативоподобного ядра сворачивания (или нуклеационного механизма сворачивания), согласно которой часть остатков цепи имеет в ядре сворачивания свою нативную (т.е. такую же, как в нативном белке) конформацию и (по крайней мере, отчасти) окружение, а остальные остатки остаются в денатурированной фазе.

Существование нуклеации хорошо совместимо с тем, что сворачивание белка протекает как переход типа «все-или-ничего» (являющимся микроскопическим аналогом фазового перехода первого рода в макроскопических системах). Нуклеация типична для фазовых переходов первого рода (например, для кристаллизации) [51].

Все это вселяет уверенность в том, что базовая картина, согласно которой остатки, уж если они вовлечены в ядро сворачивания, стоят там так же, как в нативном белке, — в основном справедлива.

«В основном», но не полностью. Облако «ненативных» остатков вокруг нативоподобного ядра явно более плотно, чем клубок. Об этом свидетельствует относительно большая величина наклона той ветви шеврона, что соответствует сворачиванию.

Более конкретно. Зная зависимость  $k_f$  и  $K = k_f/k_u$  от концентрации денатуранта ( $C$ ), можно найти величину  $\beta_T = (\delta \ln k_f / \delta C) / (\delta \ln K / \delta C)$ , отражающую относительную величину доступной растворителю поверхности переходного состояния [70]. Когда  $\beta_T$  близка к 1, доступная растворителю поверхность TS близка к таковой у нативного белка; когда  $\beta_T$  близка к 0, доступная растворителю поверхность TS близка к таковой у белка денатурированного. Как правило,  $\beta_T$  близка к  $0.6 \div 0.8$  у небольших белков. В то же время средняя по белку величина  $\langle \phi \rangle$ , равная доле «нативоподобных» взаимодействий в TS, обычно составляет  $0.3 \div 0.4$ . Разница величин  $\langle \phi \rangle$  и  $\beta_T$  свидетельствует о наличии каких-то ненативных взаимодействий [70–72] в пере-

ходном состоянии. Можно предположить, что «твердое», нативоподобное ядро TS окружено рыхлой, жидкоподобной периферией.

Ядро сворачивания порой находится в центре белка [73], но это наблюдается далеко не всегда [74]; часто оно сильно смещено к краю нативной глобулы (рис. 9).

Это показывает, что ядро сворачивания белка (folding nucleus) и его гидрофобное ядро (hydrophobic core) — вещи разные.

Гомологичные белки обычно (но не всегда) имеют сходные ядра сворачивания. Мутации, естественные и искусственные, могут порой не только сдвинуть ядро сворачивания на противоположную сторону глобулы, но и превратить четко очерченное ядро в размытое. Более того, они могут создавать и разрушать интермедиаты сворачивания (рис. 2) — и все это без существенного изменения трехмерной структуры нативного белка [75]. Это, а также то, что остатки с высокими  $\phi$ -величинами не проявляют достоверно повышенной консервативности [76], показывает, что путь сворачивания (по крайней мере, у небольшого белка, сворачивающегося быстрее, чем рибосома его синтезирует) — объект гораздо менее строгого естественного отбора, чем нативная структура [77]. Видимо, при сворачивании белка важно (для организма) только достижение нативной структуры (да еще — невовлечение интермедиатов сворачивания в «посторонние» взаимодействия [58]), а не способ достижения этого результата.

#### ПРЕДСКАЗАНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ ЯДЕР СВОРАЧИВАНИЯ В БЕЛКАХ

Для предсказания локализации ядер сворачивания в белках предлагались самые разные подходы. Наиболее интересные из них:

— использование консервативных остатков, не имеющих видимой функциональной роли [78] (этот метод, который мог бы очертить только общие для ядер сворачивания всех родственных белков остатки, не привел к успеху из-за малой консервативности [76] входящих в эти ядра остатков);

— использование молекулярной динамики для моделирования разворачивания белка [79] (это — наиболее прямой метод, но он требует гигантских вычислений и потому может быть применим только к очень маленьким белкам);

— анализ упрощенных сетей путей сворачивания-разворачивания белков (рис. 10) с использованием упрощенных оценок энергии и энтропии для поиска переходных состояний на этих путях [80–83].

Последний подход исходит из теории [47], применявшейся нами для решения парадокса Левинталя (см. главу III), и использует разворачивание известной трехмерной структуры белка для поиска положения в ней ядра сворачивания.

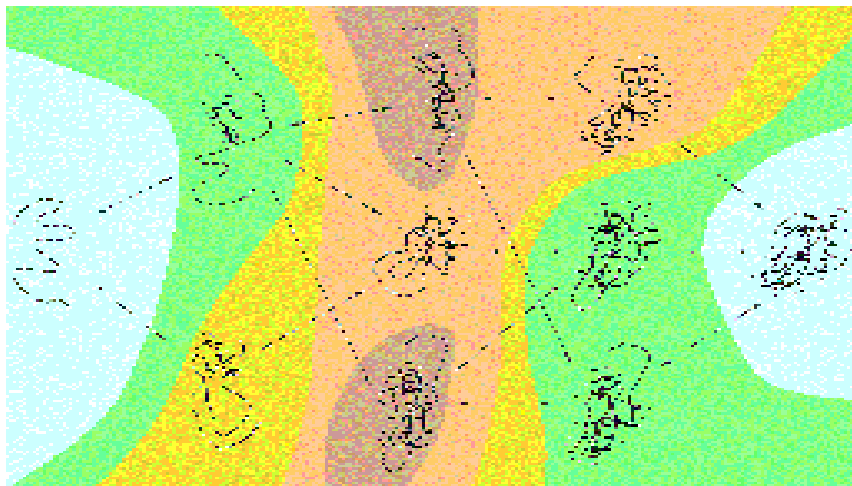


Рис. 10. Упрощенная схема сети путей сворачивания-разворачивания белка (обозначения — те же, что на рис. 4, где изображен отдельный путь сворачивания-разворачивания).

Области высокой и низкой свободной энергии изображены так, как изображаются на географической карте горы и низменности. В отличие от изображенного на рис. 3 энергетического ландшафта, изображенный здесь свободно-энергетический ландшафт учитывает энтропию, т.е., в данном случае, число конфигураций неупорядоченной части каждого микросостояния. Стрелки схематично указывают на возможные «за один шаг» переходы из одного микросостояния в другое.

В наших работах [80, 83], наиболее последовательно (что естественно) следующих общей теории [47], свободная энергия каждого «полусвернутого» микросостояния  $\Gamma$  (а также свободные энергии нативного и полностью развернутого состояний, см. рис. 10) рассматриваются в виде

$$G(\Gamma) = \varepsilon_{\text{cont}} \times n_{\text{cont}}(\Gamma) - T_0 [\sigma_{\text{unf}} \times L_{\text{unf}}(\Gamma) + \sum_{\text{loops} \in I} S_{\text{loop}}(l_i)]. \quad (5)$$

Здесь  $\varepsilon_{\text{cont}}$  — энергия одного межатома контакта,  $n_{\text{cont}}(\Gamma)$  — число таких контактов в микросостоянии  $\Gamma$ ,  $T_0$  — абсолютная температура денатурации белка (при которой, как и в главе III, ведутся все расчеты),  $\sigma_{\text{unf}}$  — энтропия остатка цепи в развернутом состоянии цепи (отсчитанная от его энтропии в «твердой» глобуле; согласно [32],  $\sigma_{\text{unf}} = 2.3R$ , где  $R$  — газовая постоянная),  $L_{\text{unf}}(\Gamma)$  — число таких развернутых остатков в микросостоянии  $\Gamma$ , а  $S_{\text{loop}}(l_i)$  — энтропия Флори, затраченная на замыкание  $i$ -й неупорядоченной петли (состоящей из  $l_i$  остатков), выходящей из нативоподобной части  $\Gamma$ ; сумма берется

по всем таким петлям. Как и в главе III, мы рассматриваем переход между нативным и развернутым состоянием цепи вблизи его середины и потому, в приличном приближении, можем не учитывать образование ненативных контактов в денатурированной фазе (ср. [84]). Энергии всех межатома контактов считаются одинаковыми (т.е. модель очень груба). Так как в середине перехода свободные энергии полностью свернутого (нативного) и полностью развернутого состояний равны, то  $\varepsilon_{\text{cont}} = -T_0 \sigma_{\text{unf}} \times L/n_{\text{cont}}(\text{в\_нативн.}_\text{стр.})$ , где  $L$ , по-прежнему, полное число остатков в белковой цепи.

Далее сеть путей разворачивания белка анализируется подходящими алгоритмами (мы использовали метод динамического программирования), и выделяются микросостояния цепи, соответствующие перевалам через свободно-энергетический хребет, отделяющий нативное состояние белковой цепи от развернутого. (Правда, для такого анализа модель приходится еще более огрубить и использовать в качестве единиц разворачивания не отдельные аминокислотные остатки, а малые, охватывающие по 3–5% белковой цепи фрагменты, — иначе сеть путей разворачивания белка становится необозримой даже для современных компьютеров). Соответствующие перевалам микросостояния цепи образуют ансамбль переходных микросостояний (TS-ансамбль). Выделив присутствующие в этих микросостояниях межатома контакты, усреднив их (с больцмановскими весами) по всему TS-ансамблю, и соотнеся с контактами, наблюдаемыми в нативном белке, — мы тем самым находим «теоретические» величины  $\phi_i$ , которые можно сравнивать с экспериментальными (рис. 11).

Теоретические оценки коррелируют с опытом, в среднем, на уровне 54% (по всем 17 белкам, где  $\phi$ -величины экспериментально получены для многих остатков). При этом корреляция выше (65%) для более точных (кристаллографических) структур и ниже (всего 34%) для менее точных структур, полученных методом ядерного магнитного резонанса [83]. Полученные результаты показывают, что теоретический расчет расположения ядра сворачивания в нативной трехмерной структуре белка (особенно — в структуре, полученной с высоким разрешением) принципиально возможен. Однако современные расчеты скорее очерчивают основные элементы ядер сворачивания, чем точно локализируют их, и при этом требуют знания детальной трехмерной структуры белка. Видимо, точное предсказание расположения ядер сворачивания в белках будет еще труднее, чем предсказание структуры белка по его аминокислотной последовательности, — тем более что строение ядра сворачивания не является, по-видимому, объектом интенсивного естественного отбора (см. конец предыдущего раздела), и потому «правильное» ядро не сильно выделяется на фоне массы своих возможных конкурентов.

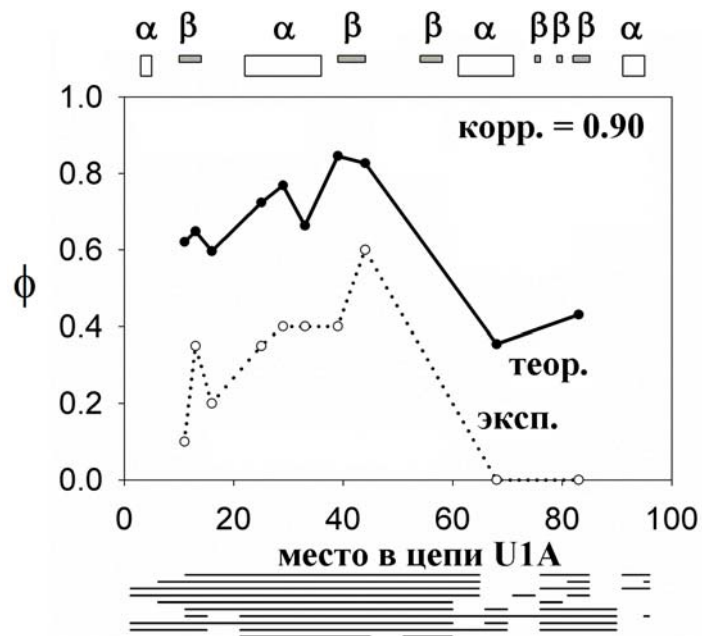


Рис. 11. Профиль  $\phi$ -величин для белка U1A (эксперимент и теория).

Точки относятся только к остаткам, для которых измерены  $\phi$ -величины, соответствующие мутациям крупных аминокислотных остатков белка дикого типа на Ala или Gly (такие замены минимально нарушают структуру белка). Адаптировано из [83]. Над графиками показана вторичная структура белка U1A. Тонкие линии под графиком показывают вычисленную локализацию «нативо-подобных» районов (ядер сворачивания) в десяти «лучших» (наименее нестабильных) представителях ансамбля переходных микросостояний. Их вычисленные свободные энергии, отсчитанные от таковой для развернутой цепи, лежат в интервале 23.9–24.2  $RT_0$ . Несмотря на близость их свободных энергий, детали локализации ядер сворачивания даже в этих «лучших» переходных микросостояниях заметно различаются.

Найденный TS-ансамбль может использоваться не только для предсказания ядра сворачивания. Он может также использоваться для предсказания скорости сворачивания белка. В самом деле, зная свободную энергию каждого из переходных микросостояний, мы можем вычислить скорость преодоления каждого из них по формуле (1) и, суммируя эти скорости, получить скорость перехода между денатурированным и нативным состояниями белковой цепи. Соответствующие расчеты [83, 85] коррелируют с опытом на уровне 76% — в общем, так же, как другие, описанные в главе III методы предсказания скоростей сворачивания белков.

## V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обратимся теперь еще раз к энергетическому ландшафту белковой цепи (рис. 3) и посмотрим, как самая стабильная структура автоматически пролагает к себе быстрые, преодолевающие парадокс Левинталя пути сворачивания.

Через очень холмистый ландшафт от каждого энергетического минимума широко расходится «воронка» более или менее гладких «дорожек», соответствующих разным путям последовательного (рис. 4) сворачивания структуры, соответствующей этому минимуму. На этих путях не происходит перестройки уже свернувшейся части глобулы, и потому «ухабы» на них невелики. Двигаясь к энергетическому минимуму, молекула выигрывает энергию, но, фиксируя свою укладку, — тут же теряет энтропию. Чем глубже энергетический минимум — тем круче ведущие к нему дорожки, тем легче преодолевать, идя по ним, «энтропийное сопротивление», всегда возникающее, когда укладка цепи фиксируется. Энергия притяжения ослабляется денатурантом; сила энтропийного сопротивления пропорционально температуре. Если денатурант сильно ослабил притяжение между звеньями цепи, или если температура очень высока, — энтропийное сопротивление выталкивает цепь из всех энергетических минимумов, так что цепь не сворачивается вообще. При очень низкой температуре (или при слишком большом притяжении между звеньями цепи), — энтропийное сопротивление мало, и цепь скатывается в любой ближайший минимум, долго из него выбирается, снова куда-то скатывается, — и никак не может дойти до глобального энергетического минимума. И, наконец, при оптимальных для сворачивания температуре и силе притяжения между звеньями цепи — энтропийное сопротивление преодолевается на пути (или путях) только к одному, очень глубокому (из-за «энергетической щели») минимуму энергии, куда белковая цепь и попадает достаточно быстро. Попадает она туда через самые низкие перевалы на свободно-энергетическом ландшафте белковой цепи (рис. 10), соответствующие (в сумме) ядру (или альтернативным ядрам) сворачивания белка. И расположение этих перевалов на свободно-энергетическом ландшафте, и их высоту можно оценить теоретически, — и, таким образом, предсказать приблизительную форму ядра сворачивания белка и скорость его сворачивания.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Мы посвящаем эту статью памяти нашего учителя О.Б. ПТИЦЫНА, одного из основоположников физики белка, которому в этом году исполнилось бы 76 лет.

Мы благодарим О.Б.Птицына, А.М.Гутина, Е.И.Шахновича, А.Я.Бадретдинова и С.А.Гарбузинского за сотрудничество и стимулирующие дискуссии, а Д.С.Рыкунова — за помощь в оформлении рисунков.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Creighton, T.E. (1991) Proteins, 2nd ed. New York: W.H. Freeman & Co. 507 p.
2. Stryer L. (1995) Biochemistry, 4th ed. New York: W.H. Freeman & Co. 1064 p.
3. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структуры и функции белков. (1996) Москва: Высшая Школа, 350 с.
4. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка, 2-е изд. (2002) Москва: Книжный Дом «Университет», 376 с.
5. Booth, P.J., Curran, A.R. (1999) Curr. Opin. Struct. Biol., **9**, 115–121.
6. Спиринов А.С. Молекулярная биология: Структура рибосомы и биосинтез белка. (1986) Москва: Высшая Школа, 300 с.
7. Phillips, D.C. (1966) Sci. Am., **215**, 78–90.
8. Hamlin, J., Zabin, I. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **69**, 412–416.
9. Komar, A.A., Kommer, A., Krasheninnikov, I.A., Spirin, A.S. (1997) J. Biol. Chem., **272**, 10646–10651.
10. Hardesty, B., Tsalkova, T., Kramer, G. (1999) Curr. Opin. Struct. Biol., **9**, 111–114.
11. Kolb, V.A., Makeev, E.V., Spirin, A.S. (1994) EMBO J., **13**, 3631–3637.
12. Goldenberg, D.P., Creighton, T.E. (1983) J. Mol. Biol., **165**, 407–413.
13. Fersht, A. (1999) Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding. New York: W.H. Freeman & Co. 631 p.
14. Lindberg, M.O., Tangrot, J., Otzen, D.E., Dolgikh, D.A., Finkelstein, A.V., Oliveberg, M. (2001) J. Mol. Biol., **314**, 891–900.
15. Ellis, R.J., Hartl, F.U. (1999) Curr. Opin. Struct. Biol., **9**, 102–110.
16. Anfinsen, C.B., Haber, E., Sela, M., White, F.H. (1961) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **47**, 1309–1314.
17. Gutte, B., Merrifield, R.B. (1969) J. Am. Chem. Soc., **91**, 501–502.
18. Levinthal, C. (1968) J. Chim. Phys. PCB, **65**, 44–45.
19. Tanford, C. (1968) Adv. Prot. Chem., **23**, 121–282.
20. Птицын О.Б. (1973) Докл. АН СССР, **210**, 1213–1215.
21. Kuwajima, K., Sugai, S. (1978) Biophys. Chem., **8**, 247–254.
22. Dolgikh, D.A., Gilmanshin, R.I., Brazhnikov, E.V., Bychkova, V.E., Semisotnov, G.V., Venyaminov, S.Yu., Ptitsyn, O.B. (1981) FEBS Letters, **136**, 311–315.
23. Гильманишин Р.И., Долгих Д.А., Птицын О.Б., Финкельштейн А.В., Шахнович Е.И. (1982) Биофизика, **27**, 1005–1016.
24. Dolgikh, D.A., Kolomiets, A.P., Bolutina, I.A., Ptitsyn, O.B. (1984) FEBS Letters, **164**, 88–92.
25. Ptitsyn, O.B. (1995) Adv. Prot. Chem., **47**, 83–229.
26. Dobson, C.M. (1994) Curr. Biol., **4**, 636–640.
27. Dyson, H.J., Wright, P.E. (1996) Ann. Rev. Phys. Chem., **47**, 369–395.
28. Jackson, S.E. (1998) Fold. Des., **3**, R81–R91.
29. Ptitsyn, O.B., Semisotnov, G.V. (1991) Conformations and Forces in Protein Folding / Eds. B.T.Nall and K.A.Dill. Washington, D.C.: AAAS. 155–168.
30. Gilmanshin, R., Callender, R.H., Dyer, R.B. (1998) Nat. Struct. Biol., **5**, 363–365.
31. Uversky, V.N., Ptitsyn, O.B. (1994) Biochemistry, **33**, 2782–2791.
32. Privalov, P.L. (1979) Adv. Prot. Chem., **33**, 167–241.
33. Segawa, S.-I., Sugihara, M. (1984) Biopolymers, **23**, 2473–2488.
34. Pfeil, W., Bychkova, V.E., Ptitsyn, O.B. (1986) FEBS Lett., **198**, 287–291.
35. Šali, A., Shakhnovich, E.I., Karplus, M. (1994) J. Mol. Biol., **235**, 1614–1636.
36. Privalov, P.L., Khechinashvili, N.N. (1974) J. Mol. Biol., **86**, 665–684.
37. Bryngelson, J.D., Wolynes, P.G. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 7524–7528.
38. Garel, T., Orland, H., (1988) Europhys. Lett., **6**, 307–310.
39. Shakhnovich, E.I., Gutin, A.M. (1989) Biophys. Chem., **34**, 187–199.
40. Shakhnovich, E.I., Gutin, A.M. (1989) Nature, **346**, 773–775.
41. Bryngelson, J.D., Wolynes, P.G. (1990) Biopolymers **30**, 177–188.
42. Гутин А.М., Бадретдинов А.Я., Финкельштейн А.В. (1992) Мол. Биол., **26**, 118–127.
43. Goldstein, R.A., Luthey-Schulten, Z.A., Wolynes, P.G. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 4918–4922.
44. Finkelstein, A.V., Gutin, A.M., Badret-dinov, A.Ya. (1995) Subcellular Biochemistry, **24**, Proteins: Structure, Function and Protein Engineering / Eds. B.B.Biswas and S.Roy. New York: Plenum, 1–26.
45. Finkelstein, A.V., Gutin, A.M., Badret-dinov, A.Ya. (1995) Proteins, **23**, 151–162.
46. Финкельштейн А.В., Бадретдинов А.Я. (1997) Мол. Биол., **31**, 469–477.
47. Finkelstein, A.V., Badretdinov, A.Ya. (1997) Fold. Des., **2**, 115–121.
48. Finkelstein, A.V., Badretdinov, A.Ya. (1998) Fold. Des., **3**, 67–68.
49. Thirumalai, D. (1995) J. Phys., **5**, 1457–1467.
50. Zana, R. (1975) Biopolymers, **14**, 2425–2428.
51. Уббелоде А.Р. Плавление и кристаллическая структура. (1969) Москва: Мир, 420 с.
52. Gō, N. (1983) Ann. Rev. Biophys. Bioeng., **12**, 183–210.
53. Флори П. Статистическая механика цепных молекул. (1971) Москва: Мир., 440 с.
54. Гросберг А.Ю., Хохлов А.Р. Статистическая физика макромолекул. (1989) Москва: Наука, 342 с.
55. Finkelstein, A.V. (1994) Curr. Opin. Struct. Biol., **4**, 422–428.
56. Sancho, E., Declerck, P.J., Price, N.C., Kelly, S.M., Booth, N.A. (1995) J. Mol. Biol., **34**, 1064–1069.
57. Kelly, J.W. (1998) Curr. Opin. Struct. Biol., **8**, 101–106.
58. Dobson, C.M. (1999) Trends Biochem. Sci., **24**, 329–332.
59. Snell, C.R., Fasman, C.D. (1973) Biochemistry, **12**, 1017–1028.
60. Финкельштейн А.В. (1978) Биоорганическая химия, **4**, 340–344.
61. Fukada, K., Maeda, H. (1990) J. Phys. Chem., **94**, 3843–3847.
62. Plaxco, K.W., Simons, K.T., Baker, D. (1998) J. Mol. Biol., **277**, 985–994.
63. Galzitskaya, O.V., Garbuzynskiy, S.O., Ivankov, D.N., Finkelstein, A.V. (2003) Proteins **51**, 162–166.
64. Ivankov, D.N., Garbuzynskiy, S.O., Alm, E., Plaxco, K.W., Baker, D., Finkelstein, A.V. (2003) Prot. Sci., **12**, 2057–2062.
65. Ivankov, D.N., Finkelstein, A.V. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **101**, 8942–8944. (Вспомогательные материалы – на [www.pnas.org](http://www.pnas.org)).
66. Jones, D.T. (1999) J. Mol. Biol., **292**, 195–202 (<http://www.pspred.net/>).
67. Mirny, L., Shakhnovich, E.I. (2001) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., **30**, 361–396.
68. Matouschek, A., Kellis, J.T.Jr., Serrano, L., Fersht, A.R. (1989) Nature, **340**, 122–126.
69. Matouschek, A., Kellis, J.T.Jr., Serrano, L., Bycroft, M., Fersht, A.R. (1990) Nature, **346**, 440–445.
70. Matouschek, A., Otzen, D.E., Itzhaki, L.S., Jackson, S.E., Fersht, A.R. (1995) Biochemistry, **34**, 13656–13662.
71. Li, L., Mirny, L.A., Shakhnovich, E.I. (2000) Nat. Struct. Biol., **7**, 336–342.
72. Galzitskaya, O.V., Ivankov, D.N., Finkelstein, A.V. (2001) FEBS Lett., **489**, 113–118.
73. Itzhaki, L.S., Otzen, D.T., Fersht, A.R. (1995), J. Mol. Biol., **254**, 260–288.

74. López-Hernández, E., Serrano, L. (1996) Fold. Des., **1**, 43–55.
75. Grantcharova, V., Alm, E.J., Baker, D., Horwich, A.L. (2001) Curr. Opin. Struct. Biol., **11**, 70–82.
76. Tseng, Y.Y., Liang, J. (2004) J. Mol. Biol., **335**, 869–880.
77. Finkelstein, A.V. Galzitskaya, O.V. (2004) Physics of Life Reviews, **1**, 23–56.
78. Shakhnovich, E., Abkevich, V., Ptitsyn, O. (1996) Nature, **379**, 96–98.
79. Daggett, V., Li, A., Itzhaki, L.S., Otzen, D.E., Fersht, A.R. (1996) J. Mol. Biol., **257**, 430–440.
80. Galzitskaya, O.V., Finkelstein, A.V. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 11299–11304.
81. Alm, E., Baker, D. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 11305–11310.
82. Muñoz, V., Eaton, W.A. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 11311–11316.
83. Garbuzynskiy, S.O., Finkelstein, A.V., Galzitskaya, O.V. (2004) J. Mol. Biol., **336**, 509–525.
84. Gö, N. (1975) Int. J. Pept. Prot. Res., **7**, 313–323.
85. Ivankov, D.N., Finkelstein, A.V. (2001) Biochemistry, **40**, 9957–9961.
86. Bernstein, F.C., Koetzle, T.F., Meyer, E.F.Jr., Brice, D., Kennard, O., Shimanouchi, T., Tasumi, T. (1977) J. Mol. Biol., **112**, 535–542.
87. Kraulis, P.J. (1991) J. Appl. Crystallogr., **24**, 946–950.