

Олегу Борисовичу Птицыну посвящается

РАСПЛАВЛЕННАЯ ГЛОБУЛА: 45 ЛЕТ СПУСТЯ

©2018 г. В. Е. БЫЧКОВА*, Г. В. СЕМИСОТНОВ,
В. А. БАЛОБАНОВ, А. В. ФИНКЕЛЬШТЕЙН

Институт белка РАН, Пуццино, Московская область

I. Введение. II. Исторический экскурс: расплавленная глобула – общее промежуточное состояние (интермедиат) на пути самоорганизации глобулярных белков. III. Множественность промежуточных состояний на пути сворачивания глобулярных белков – новое в исследовании расплавленной глобулы, включая «сухую». IV. Новое в исследовании «традиционных» белков. V. Функциональное значение и распространенность состояния расплавленной глобулы в живых системах: нетрадиционные системы, где наблюдается состояние расплавленной глобулы. VI. Решение парадокса Левинтала. VII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

45 лет назад О.Б. Птицын предложил гипотезу о стадийном механизме самоорганизации белков [1]. Данные по ренатурации глобулярных белков свидетельствовали, что информация о пространственной организации белков заложена в их первичной структуре [2, 3]. Но белковая цепь просто не в состоянии перебрать все возможные для нее конформации за разумное время, чтобы выбрать из них

Принятые сокращения: WT – белок «дикого» типа; mut – мутантный белок; N, I и U – нативное, промежуточное и развернутое состояния белка; MG – расплавленная глобула; WMG и DMG – «мокрая» и «сухая» расплавленные глобулы; ANS – 8-анилино-1-нафталеносульфоновая кислота; B-alpha-LA – коровий альфа-лактальбумин; beta-LG – бета-лактоглобулин; apoMb – апомиоглобин, ASA – доступная растворителю поверхность белка; stopped-flow и continuous-flow – остановленный- и непрерывный потоки; TS – переходное состояние; главный максимум свободной энергии при сворачивании белка; 2-state – сворачивание белков без промежуточного состояния; multi-state – сворачивание белков с промежуточными состояниями; DHFR – дигидрофолатредуктаза; FRET – флуоресцентный резонансный перенос энергии, TTET – триплет-триплетный перенос энергии, HSQC – гетероядерные одно квантовые корреляционные спектры ЯМР.

* Адрес для корреспонденции: uralm62@rambler.ru

Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда № 14-24-00157.

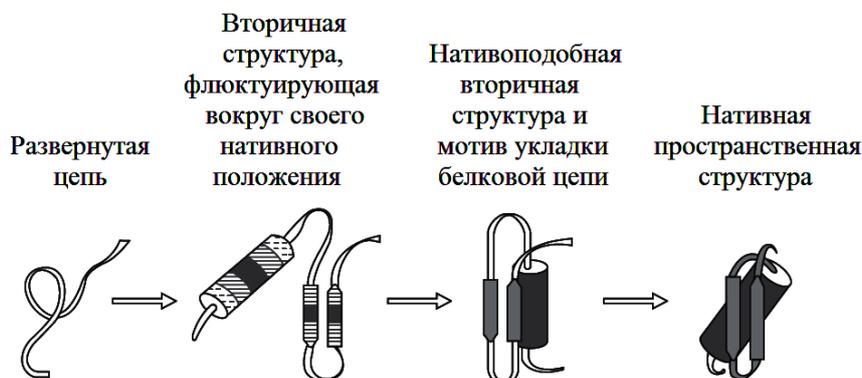


Рис. 1. Стадийная модель сворачивания белка [1].

Выделены вторичные структуры – α -спирали (цилиндры) и β -участки (стрелки). Оба предсказанные интермедиата впоследствии найдены на опыте и названы «предрасплавленной» и «расплавленной» глобулами.

свою уникальную пространственную структуру (это – так называемый «парадокс Левинталя» [4]). Поэтому было естественно предположить, что самоорганизация белковой цепи происходит как некий направленный процесс и имеет несколько стадий (рис. 1). О.Б. Птицын, практически в отсутствие на тот момент (1973 г.) экспериментальных данных, постулировал, что ключевой из них является стадия формирования того, что сейчас называется «расплавленной глобулой» [1].

В 1995 году О.Б. Птицын опубликовал обширный, обстоятельный и очень информативный обзор «Molten Globule and Protein Folding» [5], который показал, что это промежуточное состояние (расплавленная глобула – MG) возникает не только при сворачивании белка, но и при его денатурации, при взаимодействии с мембранами, при белок–белковых взаимодействиях и т.д. Обзор включал информацию о равновесной расплавленной глобуле, о фазовых переходах в белках, о кинетике и механизме сворачивания белков, о физиологической роли расплавленной глобулы.

За годы, прошедшие после опубликования этого обзора, значительный прогресс достигнут в понимании того, как полипептидная цепь находит правильный (нужный) путь для достижения нативной функциональной структуры, какие промежуточные и переходные состояния приходится преодолевать, какова энергетика этого процесса (см. обзоры [6–17] и ссылки в них). Для исследования сворачивания белков были разработаны и применены новые методы, позволяющие

определить разнообразные детали процесса образования структуры белка. В те же годы внимание исследователей сместилось в сторону изучения «неправильного сворачивания» (misfolding) белков, и, в частности, амилоидообразования [6].

II. ИСТОРИЧЕСКИЙ ЭКСКУРС: РАСПЛАВЛЕННАЯ ГЛОБУЛА – ОБЩЕЕ ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОСТОЯНИЕ (ИНТЕРМЕДИАТ) НА ПУТИ САМООРГАНИЗАЦИИ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ

Эта часть приурочена к 50-летию юбилею Института белка РАН и 50-летию Лаборатории физики белка, организованной в этом институте О.Б. Птицыным. Эта часть фиксирует внимание на гипотезе Птицына 1973 года, что процесс самоорганизации белковой молекулы должен быть результатом направленного процесса, закодированного в самих аминокислотных последовательностях и происходящего во времени через несколько стадий.

В то время в лаборатории, возглавляемой Птицыным, разрабатывалась теория образования вторичной структуры глобулярных белков [18–25]. Было показано, что стабилизация спиральных и вытянутых β -структурных участков в белковой глобуле определяется, в основном, дальними взаимодействиями по цепи, а не локальными. Однако о локализации вторичной структуры можно судить и по одним локальным взаимодействиям, потому что оба типа взаимодействий согласуются между собой: дальние взаимодействия в глобуле стабилизируют спиральные и β -структурные участки там, где они намечены локальными взаимодействиями в развернутой цепи. (Позже было показано, что статистически достоверное согласование разных взаимодействий необходимо для стабильности белковой структуры [26].) Разрабатываемые в лаборатории теории других типов вторичной структуры, таких как изгибы и петли в цепи, показали, что места их локализации также намечаются локальными взаимодействиями в развернутой цепи, а затем стабилизируются дальними взаимодействиями при образовании глобулярной структуры [1, 18–25]. Иными словами, локализация и тип вторичной структуры белка во многом определяется локальной аминокислотной последовательностью, хотя стабилизируется эта структура, в основном, не локальными, а дальними взаимодействиями в цепи.

В гипотезе Птицына предполагалось, что флюктуирующие зародыши той или иной вторичной структуры образуются в развернутой белковой цепи за счет локальных взаимодействий (в первую очередь,

водородных связей). Затем наблюдается образование компактной глобулярной структуры путем «схлопывания» предсуществующих зародышей вторичной структуры (рис. 1). Но эта «промежуточная» компактная структура еще отличается от уникальной нативной структуры белка, а ее образование обусловлено, в основном, неспецифическими взаимодействиями аминокислотных остатков с окружающей средой (водой и гидрофобным ядром образующейся глобулы) [1, 21].

Как предположил Птицын, далее образование уникальной нативной структуры белковой молекулы происходит путем подстройки сформированной промежуточной структуры. На этом этапе основную роль должны играть специфические силы взаимодействия сближенных аминокислотных остатков. Эти положения были основаны на результатах теории спиральной структуры глобулярных белков, которые свидетельствовали о том, что стабилизация спиральных участков в компактных глобулах определяется, в основном, дальними взаимодействиями, а не локальными, сила и специфичность которых не велика. [19, 20, 23, 25].

ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА

Образование вторичной структуры имеет большое значение, так как оно не только способствует уменьшению объема белковой цепи и её перехода из водного окружения в глобулу, но и необходимо для появления ее правильной топологии (хода в пространстве), что уже является элементом третичной структуры белка. Это предположение позднее было подтверждено экспериментально [27, см. также 47, 75, 78–80]. В этих работах было показано, что образование водородных связей приводит к компактизации белка при переносе белковой цепи, развернутой мочевиной, в условия «плохого» растворителя (каким вода является для белка) [27, 28].

Как правило, на ранних стадиях сворачивания белка появляются зародыши той вторичной структуры, что наблюдается в нативном белке. Однако интересный случай исключения из этого правила представляет белок бета-лактоглобулин (β -LG) [29–32]. У него обнаружен ранний кинетический интермедиат с ненативной α -спиралью. Появление такой спирали в раннем кинетическом интермедиате (до образования глобулы) не слишком удивительно, так как тот участок последовательности β -LG, в котором возникает эта α -спираль, сам по себе кодирует именно α -спиральную структуру, а её переход в β -структуру связан уже с третичными взаимодействиями. Этот пример показывает, что вышеупомянутое согласование разных взаимодействий в белках имеет именно статистический, а не абсолютный характер [26].

РАВНОВЕСНОЕ ПРОМЕЖУТОЧНОЕ СОСТОЯНИЕ – MG

Гипотеза О.Б. Птицына 1973 года получила свое развитие в последующих работах автора [21, 23, 33–35]. Одновременно при экспериментальном исследовании денатурации белков было показано появление равновесного промежуточного состояния [36], названного «расплавленной глобулой» («Molten Globule») [37], обладающего свойствами предсказанного в 1973 году интермедиата сворачивания белка [34, 36, 39, 38 и ссылки в нем; см. также обзор 10]. Изучение кинетики сворачивания белков также выявило наличие кинетических интермедиатов [34, 35, 38, 40, 41, 5 и ссылки в нем] типа расплавленной глобулы.

Лаборатория физики белка Института белка принимала активное участие в этих исследованиях [41–44, см. также ссылки в обзоре 45]. В лаборатории был предложен метод для тестирования доступности гидрофобного ядра MG растворителю, с использованием «окрашивания» расплавленных глобул красителем ANS [43, 44, 46]. Этот метод оказался очень полезным для регистрации равновесной MG [46].

Как было подчеркнуто в гипотезе О.Б. Птицына, образование нативо-подобной топологии является обязательным требованием при образовании MG. Позже это было показано для Va-LA [47, 75, 78], белка холодового шока [48] и для других белков [49, см. также 10].

СВОРАЧИВАНИЕ БЕЛКОВ С ПРОМЕЖУТОЧНЫМИ СОСТОЯНИЯМИ (MULTI-STATE PROTEINS) И БЕЗ (2-STATE PROTEINS)

Исследование кинетики сворачивания различных белков выявило, что, в основном, белки сворачиваются через образование промежуточных состояний [41, 49, 50]. Белки, имеющие более двух состояний (нативное, одно или несколько «промежуточных», и полностью развернутое) получили название «multi-state proteins». На пути их сворачивания находится не один, а по крайней мере два свободно-энергетических барьера (рис. 2).

Однако ряд белков, в основном небольших, сворачивается через один барьер, т.е. у них (у 2-state белков) есть только два состояния: нативное и развернутое (рис. 2а) [49–51]. Галзитская и др. [52], а затем Kamagata и др. [49, 50] проанализировали имеющиеся данные по кинетике сворачивания обоих типов белков. Они пришли к выводу, что константы скоростей сворачивания multi-state белков (значительно различающихся по размеру) существенно коррелируют с длиной цепи белка. В то же время, различия скоростей сворачивания небольших 2-state белков коррелируют с нативной топологией основной цепи (точнее – со средним расстоянием по цепи между контактирую-

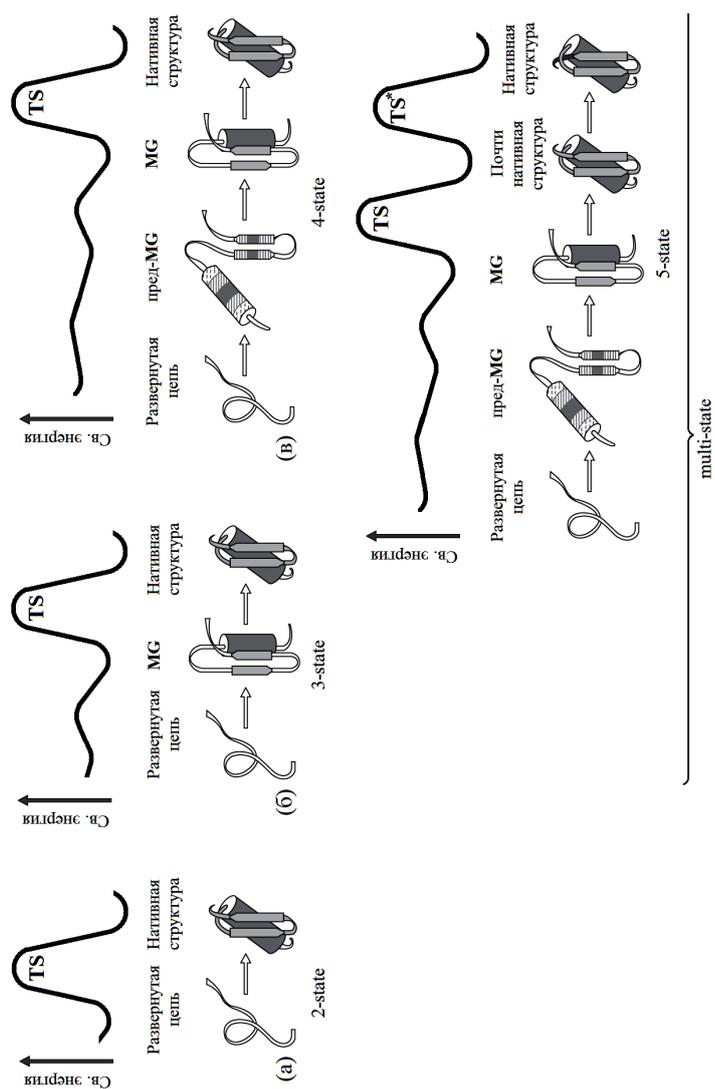


Рис. 2. Профили свободной энергии для сворачивания белков, имеющих на пути сворачивания два (а), три (б) четыре (в) и пять (д) состояний (минимумов свободной энергии), т.е. сворачивающиеся в одну, две, три и четыре кинетических стадии, соответственно. Главное, лимитирующее скорость процесса переходное состояние (главный максимум свободной энергии), TS или TS*, всегда находится перед плотноупакованным, нативным или «почти нативным» состоянием, переходом между которыми зачастую связан с изомеризацией пролинов в плотноупакованной глобуле [41].

щими в нативной структуре белка а.к. остатками) [53], но не с ее длиной, хотя корреляция с длиной становится существенной, если включить в расчет и крупные 2-state белки [54] (которых, правда, немного). Kamagata и др. [49] заключили, что сворачивание multi-state белков (рис. 2b, 2c) с накоплением продуктивного кинетического интермедиата (т.е. MG) представляет собой общую модель для механизма сворачивания белков, а сворачивание 2-state белков (происходящее без промежуточного состояния) представляет собой упрощенную версию (см. рис. 3) этого более общего механизма.

Наличие интермедиатов в сворачивании даже тех белков, которые первоначально считались 2-state белками, отмечается в обзоре [11]. Рисунок 3 поясняет, почему белок может проявлять свойства 2-state белка в одних условиях и multi-state белка – в других.

Авторы работы [11] отмечают, что нелинейность зависимости логарифма скорости сворачивания от конечной концентрации денатуранта (рис. 4), наблюдаемая порой в кинетике сворачивания 2-state белков, часто вызывается наличием интермедиатов, которые стабильны (по сравнению с U) только при малых концентрациях денатурантов, но дестабилизируются (и потому не наблюдаются) при возрастании их концентрации. Они отмечают также, что модель последовательного сворачивания белка предсказывает стабилизацию интермедиатов при определенных условиях, и что такая стабилизация интермедиатов может происходить при изменении состава растворителя. Так, добавление сульфата натрия (повышающего стабильность белковых структур) приводит к появлению дополнительной «взрывной» фазы (отражающей присутствие интермедиатов) в мутантах убиквитина [56] и тендаместата [57]; а изменение pH вызывает появление 3-state сворачивания в хисакстофилине [58]. Для белка G и иммунного модулятора Im совместное изменение pH и добавление сульфата натрия также приводит к появлению интермедиатов сворачивания [59, 60]. Как уже отмечалось, появление интермедиатов отражается в нелинейности зависимости констант скоростей сворачивания от конечной концентрации денатуранта (шеvronные графики; см. рис. 4).

Такое поведение кинетических графиков наблюдается при изменении температуры и при введении мутаций в Pin WW-домене [61, 62]. Авторы подчеркивают, что разница между 2-state и multi-state сворачиванием белка связана с различием в относительной стабильности частично-свернутых интермедиатов. Они отмечают, что вышеупомянутую кривизну левой части шевронного графика (см. рис. 4) вызывают (ввиду изменения скорость–лимитирующего шага) только

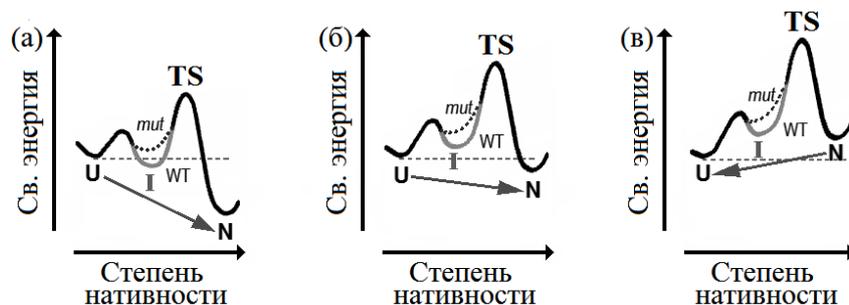


Рис. 3. Схема, показывающая, что один и тот же белок может вести себя как 3-state в одних условиях и как 2-state в других, хотя у него всегда есть локальный минимум свободной энергии, соответствующий интермедиату сворачивания. Главный, лимитирующий скорость всего процесса максимум свободной энергии (TS) находится перед состоянием N.

(а) Профиль свободной энергии для перехода из развернутого (U) состояния в нативное (N) через интермедиат (I) для случая, когда N много стабильнее, чем U. Здесь интермедиат I стабилен (по сравнению с U) в белке дикого типа (WT), и не стабилен в белке с мутацией (*mut*); это различие показано в районе I серой частью сплошной кривой и точечной кривой, соответственно; рисунок отражает ситуацию, когда мутация влияет только на интермедиат I. Переход из U в N происходит в две стадии ($U \rightarrow I \rightarrow N$) для белка WT (ведущего себя как 3-state белок), потому что интермедиат I (находящийся перед TS) стабильнее, чем U. Но он как бы происходит в одну стадию ($U \rightarrow N$) для *mut*, белка с мутацией (ведущего себя как 2-state белок), потому что интермедиат I нестабилен по сравнению с U и, следовательно, не наблюдается на опыте.

(б) Переход из U в N для случая, когда N лишь немного стабильнее, чем U. Повышение свободной энергии, сближающее стабильность N со стабильностью U, автоматически делает состояние I нестабильным и для WT-белка (как и для *mut*-белка), и тогда переход $U \rightarrow N$ в нем протекает в одну стадию, т.е. WT-белок (как и *mut*) ведет себя как 2-state белок.

(в) Переход из N в U для случая, когда U стабильнее, чем N. Он происходит в одну стадию, $N \rightarrow U$ (т.е. как переход типа «всё–или–ничего» [55] в 2-state белке), поскольку лимитирующий скорость всего процесса максимум свободной энергии (TS) находится между состояниями N и I, так что медленный переход $N \rightarrow I$ маскирует последующий быстрый переход $I \rightarrow U$.

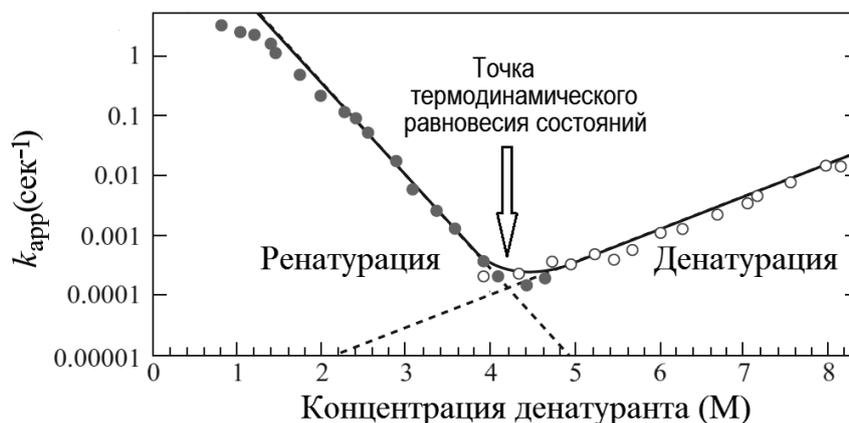


Рис. 4. Характерный вид «шеvronного графика» – зависимости скорости приближения к равновесию (k_{app}) между нативным и денатурированным состояниями молекулы белка от концентрации денатуранта.

интермедиаты, стабилизирующиеся при уменьшении концентрации денатуранта.

Те же авторы предполагают, что наличие интермедиатов является важным для процесса сворачивания потому, что создается суженное конформационное пространство, облегчающее поиск нативных контактов (см. также [63]).

ОБНАРУЖИВАЕМЫЕ В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ ИНТЕРМЕДИАТЫ СВОРАЧИВАНИЯ НАХОДЯТСЯ В ОДНОЙ И ТОЙ ЖЕ ОБЛАСТИ ДИАГРАММЫ КОНФОРМАЦИОННЫХ СОСТОЯНИЙ БЕЛКА

Часто возникает вопрос, – являются ли состояния интермедиатов, полученные в разных условиях (рН, концентрация денатуранта, температура) разными состояниями, или это всё проявления одного и того же промежуточного состояния? Для ответа на этот вопрос было проведено исследование денатурации белка (апомиоглобина кашалота) и построена трёхмерная диаграмма его конформационных состояний в трех координатах – рН, температура, концентрация денатуранта (мочевины). В результате был сделан вывод, что все промежуточные состояния апомиоглобина принадлежат одной и той же области диаграммы, и между ними не наблюдается конформационных переходов [64].

III. МНОЖЕСТВЕННОСТЬ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ СОСТОЯНИЙ НА ПУТИ СВОРАЧИВАНИЯ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ – НОВОЕ В ИССЛЕДОВАНИИ РАСПЛАВЛЕННОЙ ГЛОБУЛЫ, ВКЛЮЧАЯ «СУХУЮ»

К вопросу о сворачивании белков примыкает проблема разнообразия промежуточных состояний. Еще в 1989 году Финкельштейном и Шахновичем была предложена теория термодинамических состояний белковой цепи [65–67]. Согласно ей, у цепи есть стабильное (или метастабильное) состояние типа расплавленной глобулы (MG), находящееся – по ходу сворачивания – между нативным и развернутым состояниями. Согласно той же теории, расплавленная глобула может быть, как «мокрой» (когда растворитель входит в поры расплавленного, разрыхленного белка), так и «сухой» (когда растворитель не входит в эти поры: см. рис. 5). Теория [65–67] показывает, что обычно «мокрая» расплавленная глобула (WMG) должна быть стабильнее, чем «сухая» (DMG). Именно мокрая расплавленная глобула обычно наблюдается в белках [68].

Развитие более чувствительных экспериментальных методов позволило обнаружить сухую расплавленную глобулу экспериментально. Ею оказался, например, изученный в работе [69] интермедиат в разворачивании рибонуклеазы А (RNase). Результат этой работы содержится в ее названии «Direct NMR evidence for an intermediate preceding the rate-limiting step in the unfolding ...» («Прямое свидетельство ЯМР, что скорость-лимитирующему шагу разворачивания предшествует интермедиат ...»), причем, согласно утверждению авторов работы, этот интермедиат оказался [69] сухой расплавленной глобулой, предсказанной в [66]! Таким образом, вопреки содержащемуся в [65–67] утверждению, что главное переходное состояние расположено между нативной структурой и расплавленной глобулой (см. рис. 5а), оно оказалось порой расположенным между сухой и мокрой расплавленными глобулами (см. рис. 5б).

Более прямое доказательство существования «сухого» интермедиата DMG при разворачивании белка монеллина было получено в работе [70]. Разворачивание монеллина денатурантом GdmCl наблюдалось как в равновесии, так и в кинетике методом FRET, а также КД и связыванием ANS. Было показано, что в начале разворачивания резко меняется расстояние между С-концом единственной спирали и Trp остатком, близким к N-концу этой спирали. Но в то же время, по данным Trp флуоресценции и по связыванию ANS, вода еще не проникает в ядро белка. Эти эксперименты напрямую указывают на наличие DMG на начальной стадии разворачивания монеллина. В

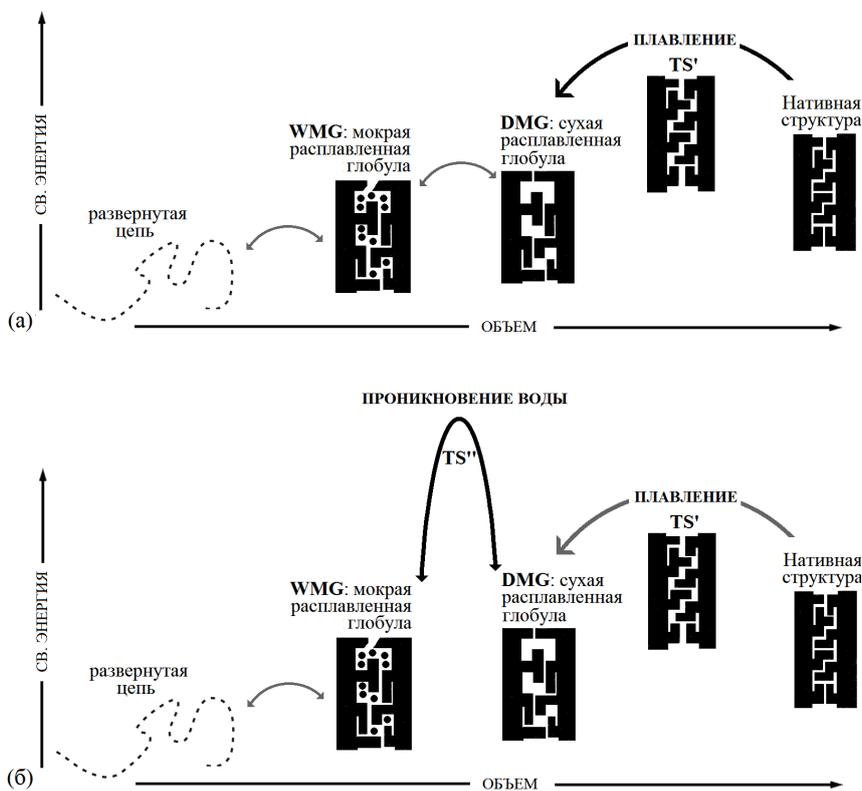


Рис. 5. Компактные стабильные состояния белковой глобулы (плотнупакованное нативное и расплавленное, более рыхлое), нестабильное переходное состояние (TS') для процесса плавления глобулы, находящееся между ними, и развернутая цепь. Расплавленная глобула, может быть, как «мокрой» (с молекулами растворителя в порах разрыхлённого белка), так и «сухой» (без растворителя в этих порах). Поры в расплавленной глобуле достаточно велики для свободы колебания боковых групп. Переходное состояние для плавления нативной структуры изображено очень схематично (как однородная структура с меньшими, чем в MG, порами, которые *уже* нарушают взаимодействия в глобуле, но *еще* слишком малы для свободы колебания боковых групп, что и делает TS' нестабильным [65, 66]). Это переходное состояние само по себе неоднородно: оно состоит из нативо-подобной и денатурированной частей [см. ниже 92].

(а) TS' является главным переходным состоянием в процессе денатурации белка (случай, рассмотренный в [65–67]).

(б) Главным переходным состоянием в процессе денатурации является TS'', переходное состояние для процесса проникновения воды в глобулу (случай, не рассмотренный в [65–67], но обнаруженный экспериментально в ряде работ [69, 70]).

начале разворачивания происходит увеличение объема молекулы, что приводит к частичному разрыву нативных контактов, но без проникновения воды в гидрофобное ядро белка. Авторы делают вывод, что денатурация нативной структуры белка происходит кооперативно, а последующее набухание глобулы – постепенно (как то было предсказано в [67]).

Дальнейшее развитие этого вопроса получило в работах Baldwin и Rose (см. обзоры [13], [15] и ссылки в них). Авторы подчеркивают, что обнаружение DMG-интермедиатов разрушает концепцию модели 2-state сворачивания белка как одностадийного процесса. Они отмечают, что пока состояние DMG обнаружено в разворачивании всего нескольких белков – это RNase A [69] (см. выше), дигидрофолатредуктаза (DHFR), для исследования которой пять остатков триптофана были заменены на 6–19F-триптофан и использован метод ЯМР в остановленном потоке [71], монеллин (см. выше) [70] и виллин (HP35) [72]. Для исследования HP35 был использован метод ТТЕТ (триплет–триплетный перенос энергии). Обратимое равновесие было обнаружено между плотноупакованными и неплотно-упакованными состояниями в зависимости от температуры и концентрации GdmCl. Для этого белка наблюдались конформационные флуктуации, которые разрушали Ван-дер-Ваальсовы контакты между Trp белка и введенной в белок меткой.

Развитие этой темы нашло свое продолжение при детальном исследовании сывороточного альбумина человека (HSA) [73]. В этой работе обнаружено появление DMG в равновесном интермедиате при pH-индуцируемом разворачивании белка. В работе использован большой набор методов – FRET, динамическое тушение флуоресценции, ближний и дальний UV CD. Полученные результаты привели к выводу, что два из трех доменов HSA обнаруживают свойства DMG, т.е. они имеют больший объем по сравнению с нативным белком и в них нарушена плотная упаковка боковых групп, но при этом гидрофобное ядро этих доменов не сольватировано, т.е. остается сухим. Разрыв связей между боковыми группами и сольватация гидрофобного ядра этих доменов HSA происходят на разных этапах разворачивания белка понижением pH, а не одновременно, как то обычно наблюдается [73].

Появление и DMG, и WMG, и сольватированного переходного состояния между ними было обнаружено для белка барстар (barstar) в процессе его разворачивания [74]. Используя разные варианты флуоресценции и КД, авторы обнаружили, что в нативо-подобном интермедиате наблюдается ослабление третичных взаимодействий

при разворачивании белка мочевиной, но структура ядра сохраняется, и вода не проникает в гидрофобное ядро. Полученные результаты позволяют предложить путь сворачивания барстар: WMG образуется быстро из развернутого состояния; затем сворачивание замедляется, предполагая, что скорость-лимитирующий шаг сворачивания находится между WMG и DMG. Но DMG трудно исследовать в этих условиях, так как она образуется уже после скорость-лимитирующего шага [74].

IV. НОВОЕ В ИССЛЕДОВАНИИ «ТРАДИЦИОННЫХ» БЕЛКОВ

ТРАДИЦИОННЫЕ БЕЛКИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ MG: НОВЫЕ ДАННЫЕ

За годы, прошедшие после опубликования О.Б. Птицыным в 1995 году очень обстоятельного и обширного обзора о расплавленной глобуле, было проведено много новых исследований. Для белков, традиционных для изучения состояния MG, проведенные исследования касались деталей структуры MG и особенностей поведения белков при внесении точечных аминокислотных замен или при существенном изменении внешних условий.

α -Лактальбумин

а) Kuwajima и его группа опубликовали обзор, охватывающий кинетические и гидродинамические аспекты формирования MG [75, 10]. Имеющиеся данные подтверждают, что MG этого белка (α -LA) гетерогенна: альфа-домен структурирован, а бета-домен значительно развернут. Но это состояние уже имеет нативо-подобную укладку основной цепи. Образование MG из полностью развернутой цепи происходит за миллисекунды [75, 10]. Стабильность структуры кинетического интермедиата является той же самой, что и в равновесной MG, и этот кинетический интермедиат является обязательным на пути сворачивания этого белка в нативную структуру.

б) α LA является Ca^{2+} -связывающим белком. В работе Wu и др. [76] было показано, что связывание Ca^{2+} происходит с β -доменом α LA, и это приводит к кооперативному образованию третичных взаимодействий, способствуя более быстрому переходу из MG в нативное состояние.

в) Исследование кинетики сворачивания α LA методом ЯМР обнаружило, что на ранней стадии сворачивания белка формируется до 85% спиральной структуры, и кинетика, тестируемая ЯМР, показывает, что белок уже обладает почти нативной компактностью [47]. H/D

обмен, масс-спектрометрия и ЯМР свидетельствуют, что структура возникает, в основном, в α -спиральном домене. Однако остальная часть белка, β -домен, сворачивается медленнее, а добавление Ca^{2+} стабилизирует уже возникшую структуру и ускоряет конверсию MG в нативное состояние. В этой работе четко показано, что общая топология полипептидной цепи в MG состоянии является нативо-подобной, особенно в α -домене, который сворачивается быстро, а замедление скорости сворачивания связано с формированием структуры в β -домене и в переходном состоянии [10, 75].

г) В работе Quezada и др. [77] было изучено влияние мутаций на кооперативность сворачивания/разворачивания MG лактальбумина человека, особенно замен на Pro, методом ^{15}N -H 2D HSQC NMR, когда появление хорошо выраженных резонансов связано с некооперативным разворачиванием под действием денатурантов [77]. При низких концентрациях денатуранта появляются резонансы, соответствующие сегментам расплавленной глобулы αLA в наименее стабильных областях структуры. Эксперименты были проведены для αLA с одной (Cys28–Cys111) дисульфидной связью. Показано, что введение мутаций в α -спираль сильно сказывается на стабильности MG этого белка. Было обнаружено, что области, содержащие пептиды 1–38 и 95–120, объединенные Cys28–Cys111 связью, не только обладают высокой степенью спиральности, но и характерными чертами MG, включая связывание гидрофобного зонда ANS. Авторы заключили, что MG лактальбумина скорее стабилизируется относительно большим числом неспецифических гидрофобных взаимодействий, чем малым числом высокоспецифичных [77].

д) Состояние расплавленной глобулы α -лактальбумина может быть вызвано воздействием повышенной температуры, спиртов и даже присоединением олеиновой кислоты. При этом, последний комплекс может вызвать апоптоз раковых клеток, а это уже функциональная роль MG. Группа Fontana провела сравнительное изучение коровьего α -лактальбумина методами КД и ограниченного протеолиза. Структурные черты полученных интермедиатов (при 45° и нейтральных pH, при 15% ТФУК или при 7.5 эквивалентах олеиновой кислоты) оказались сходны с MG лактальбумина при pH 2. Ограниченный протеолиз протеиназой K выявил, что расщепляются, в основном, пептидные связи в β -домене, а протеолитические фрагменты связаны между собой четырьмя S-S связями. Основной вывод работы сводится к тому, что расплавленная глобула αLA сохраняет нативо-подобный ход основной цепи (tertiary fold), проявляющийся в хорошо структурированном α -домене [78].

е) Развитие методов ЯМР (фотохимически наведенная динамическая поляризация ядер с использованием техники импульсного мечения (photo-CIDNP)) позволило изучать упаковку боковых групп в частично-свернутых состояниях и в кинетических интермедиатах за реальное время экспериментов по сворачиванию белка [79]. Этим новым методом были охарактеризованы различные состояния МГ коровьего и человеческого α -LA на уровне индивидуальных а.к. остатков. Photo-CIDNP позволяет различить взаимодействия ароматических остатков, таких как Trp, Tyr и в меньшей степени His. Было обнаружено, что сравнительно небольшое число групп, недоступных растворителю в ядре МГ, стабилизирует общий ход цепи. При этом контакты между гидрофобными остатками, вовлеченными в стабилизацию укладки цепи, вовсе не обязательно должны быть нативными.

ж) Для характеристики и сравнения состояний МГ была использована также рамановская оптическая активность (ROA), развитая в группе L. Bağcıoğlu. Этот метод измеряет вибрационную оптическую активность благодаря небольшим различиям в интенсивности рассеяния право- и лево-поляризованного света. Этот метод позволяет различить в спектре полосы, характерные для петель и поворотов, а также для элементов вторичной структуры и для боковых цепей [80]. Поэтому можно получить информацию об укладке основной цепи и о динамическом аспекте структуры белка. Этим методом были сравнены структуры МГ лизоцима лошади (связывающего Ca^{2+}) и коровьего α -LA. Была получена информация о гидратации α -спиралей. Сопоставление результатов позволило заключить, что МГ лизоцима лошади имеет более структурированное ядро по сравнению с α -LA, включающее взаимодействие трех защищенных спиралей против двух в α -LA. Кроме того, было обнаружено, что структура Ca^{2+} -связывающей петли сохраняется даже в отсутствие Ca^{2+} [80].

β -Лактоглобулин

а) Интересный случай представляет сворачивание β -лактоглобулина (β -LG), для которого наблюдается появление ненативной α -спиральной структуры во «взрывной» фазе, соответствующей появлению интермедиата при сворачивании этого, в основном, β -структурного белка [см. выше 29, 30, 32]. Для изучения сворачивания β -LG были использованы методы stopped-flow КД и оптического поглощения. Они показали, что основные свойства этого интермедиата сходны с таковыми, наблюдаемыми для других белков. Исследование сворачивания β -LG в субмиллисекундном диапазоне (КД и малоугловое рассеяние рентгеновских лучей (SAXS)) показало, что конформация

раннего интермедиата очень компактна, почти как у нативного белка [32]. При этом особенностью β -LG является то, что в его развернутом состоянии присутствует остаточная β -структура, а в интермедиате появляется ненативная α -спираль, причем в той части его аминокислотной последовательности, где ее образование закодировано локальными взаимодействиями.

б) Sakurai и др. было предположено [30], что появление α -спирали необходимо, чтобы ускорить сворачивание белка и предотвратить его агрегацию. В духе гипотезы В.И. Лима об образовании высокоспиральных промежуточных глобул [81] было предположено, что образование ненативной α -спирали способствует образованию дальних по цепи контактов с нативной спиралью, что стабилизирует структуру интермедиата и способствует трансформации ненативной α -спиральной структуры в правильно свернутую β -структуру нативного белка [32].

в) С другой стороны, для коротких N-концевых фрагментов апомиоглобина, полностью спирального белка, было обнаружено, что они, слипаясь, образуют бета-структуру и даже способны образовывать амилоиды [82]. Авторы объясняют этот факт тем, что короткие спиральные фрагменты не могут эффективно упаковаться в гидрофобное ядро на внутримолекулярном уровне, и поэтому для экранировки гидрофобных групп требуется самоассоциация (или взаимодействие с шаперонами).

Апомиоглобин

а) Наибольшее внимание исследователей было привлечено к изучению процессов сворачивания/разворачивания апомиоглобина – полностью спирального белка. Наиболее интенсивно изучение кинетики сворачивания проводится в группе P. Wright (см. обзор [17 и ссылки в нем]). Было показано, что дестабилизация спирали N заменами ее а.к. остатков на Gly приводит к изменению пути сворачивания apoMb [83]. Чтобы получить более детальную информацию о ранних событиях в сворачивании apoMb, были использованы новые методы, позволяющие выявить детали в процессе сворачивания. Метод непрерывного потока в сочетании с методами КД и SAXS позволил обнаружить быстрое образование спиралей и коллапс структуры за мертвое время эксперимента ($<300 \mu\text{s}$) [84]. Быстрое сворачивание apoMb (через $400 \mu\text{s}$), тестируемое Н/Д обменом и 2D ЯМР, обнаружило образование компактного состояния. Оно включало в себя основные части A, G и H спиралей, которые были уже не доступны для Н/Д обмена, а спирали B, E и C подвергались Н/Д обмену позднее и стабилизировались уже на миллисекундной шкале, подтверждая иерархический характер сворачивания apoMb [85].

б) Измерение уширения линий ЯМР в спин-меченых образцах позволяет выявить меняющиеся во времени гидрофобные взаимодействия между разными участками полипептидной цепи, которые возникают при инициации сворачивания белка. Учет средней поверхности, погруженной внутрь структуры при сворачивании белка, позволил выявить многочисленные гидрофобные кластеры различной стабильности, которые носят как нативный, так и ненативный характер. Используя направленное спин-мечение, было обнаружено повышение парамагнитной релаксации в развернутом состоянии белка. Локализация спин-меченых остатков проводилась с использованием ^1H - ^{15}N HSQC NMR для аромб в кислых рН. В этой же работе [86] обсуждается роль погруженной внутрь белка поверхности в инициации гидрофобного коллапса.

в) С помощью дисперсии релаксации ядер ^{15}N , $^1\text{H}^{\text{N}}$ и ^{13}C в ЯМР были исследованы спонтанные процессы сворачивания и разворачивания аромб. Выше рН 5.0 дисперсия определяется флуктуациями района F-спирали, невидимого на спектрах ЯМР. Путем измерения релаксации остатков, контактирующих с F-спиралью в нативном состоянии, было обнаружено переходное состояние, образуемое локальным разворачиванием спирали F и удалением ее от ядра белка. Это переходное состояние оказалось сходным с тем, которое наблюдалось для равновесной MG аромб в условиях высокой температуры при низких рН [87]. Анализ полученных данных приводит к выводу, что в этом состоянии наблюдаются изменения в основной цепи белка и в других районах цепи, свидетельствуя о существенных перестройках нативного и MG состояний или упаковки цепи в них. Авторы считают, что метод дисперсии релаксации ядер может быть применен при умеренно дестабилизирующих условиях, когда кинетики сворачивания и разворачивания могут быть измерены в условиях одного эксперимента. Этот метод может быть применен для характеристики раннего интермедиата разворачивания, что важно также для понимания агрегации белка и образования амилоидов [88].

г) MG в аромб является «мокрой»; вопрос о динамике воды в неполярном ядре MG был рассмотрен в работе [88; см. также ссылки в ней]. Для изучения динамики гидратации были использованы методы динамической ядерной поляризации и ЭПР. Первый дает возможность исследовать локальную динамику растворителя в радиусе 10 Å от спиновой метки, тогда как последний позволяет тестировать полярность в районе метки и подвижность спин-меченого белка. Было обнаружено, что неполярное ядро аромб в состоянии MG гидратировано молекулами воды, подвижность

которых только в 4–6 раз меньше, чем в свободном растворителе. При этом в развернутом состоянии белка при pH 2 гидратная вода диффундирует быстро. Вывод из работы состоит в том, что динамика воды в apoMb является сайт-специфической и зависящей от степени сворачивания; при этом поверхностные в нативном белке остатки могут быть менее гидратированы в MG, чем в нативном белке. Присутствие диффундирующей (хоть и медленно) гидратной воды может облегчать конформационные перестройки, консолидирующие слабо упакованные в MG боковые цепи в компактное, свободное от воды нативное гидрофобное ядро [88; см. также ссылки в ней].

д) В 1999 году О.Б. Птицын сопоставил 728 последовательностей глобинов и обнаружил, что имеется только 6 консервативных и не связанных с гемом остатков в их структуре. Эти остатки были расположены попарно на спиралях А (Ala10 и Trp14), G (Ile111 и Leu115) и H (Met131 и Leu135) [89]. Было предположено, что эти нефункциональные консервативные остатки необходимы для быстрого и правильного сворачивания а.к. последовательности апомиоглобина в его стабильную трехмерную структуру.

В лаборатории О.Б. Птицына были получены соответствующие мутантные белки, также как и 6 других, содержащих замены неконсервативных остатков на Ala, но важных для сворачивания белка с теоретической точки зрения – как оказывающих значительное влияние на скорость сворачивания apoMb [90, 91]. Это – остатки в спиралях В (I28, F33), С (L40), D (M55) и E (L61, L76). Для всех полученных мутантных белков было изучено pH-зависимое разворачивание и определены термодинамические параметры конформационных переходов U→I и I→N, а также параметр ϕ Фершта (отражающий сравнительный вклад замещенных боковых групп в стабилизацию промежуточного состояния [92]). Анализ этих данных привел к выводу, что сила взаимодействия боковых групп в промежуточном состоянии MG не превышает 50% от силы их взаимодействия в нативном состоянии для консервативных остатков, а для неконсервативных близка к 0% [93, 94]. Это подтвердило предположение Птицына, что консервативные остатки являются важными для интермедиата в сворачивании apoMb, и что структура этого промежуточного состояния служит основой для формирования других спиралей, а затем и нативного состояния этого белка.

Для этих же мутантных белков было проведено кинетическое исследование их сворачивания в широкой области концентраций мочевины, тестируемое Trp флуоресценцией. Используя только кинетические данные, было показано, что процесс сворачивания apoMb

вовлекает одно промежуточное состояние, сходное с равновесной МГ. Использование 12-ти мутантных форм позволило уточнить роль выбранных аминокислотных остатков в стабильности белка и скорости образования его нативной формы. Было обнаружено, что введенные мутации сильно сказываются на стабильности нативного состояния мутантных белков, и мало – на стабильности промежуточного. Было показано, что а.к. остатки А, G, H-спирального комплекса вносят вклад в стабильность промежуточного состояния и ядра сворачивания в $U \rightarrow I \rightarrow N$ переходе. В то же время, в $I \rightarrow N$ переходе ядро сворачивания образуется уже после образования А, G, H-комплекса и включает, в основном, остатки, принадлежащие В, С, Е-спиралям [95]. Таким образом, впервые были получены значения параметра ϕ Фершта для того же самого барьера, который существует в обоих $I \rightarrow N$ и $U \rightarrow I \rightarrow N$ переходах аромВ.

Суммируя результаты этих исследований, можно сделать вывод, что консервативные остатки в структуре аромВ играют более существенную роль в переходе $U \rightarrow I$, как это было предположено О.Б. Птицыным [89], и что эти же остатки также важны для формирования промежуточной структуры на начальной стадии сворачивания этого белка. При этом сила взаимодействий боковых групп возрастает шаг за шагом, достигая максимума в нативном состоянии аромВ.

V. ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ И РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ СОСТОЯНИЯ РАСПЛАВЛЕННОЙ ГЛОБУЛЫ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ: НЕТРАДИЦИОННЫЕ СИСТЕМЫ, ГДЕ НАБЛЮДАЕТСЯ СОСТОЯНИЕ РАСПЛАВЛЕННОЙ ГЛОБУЛЫ

Представляется важным и интересным, что ареал обнаружения расплавленной глобулы расширяется со временем. Кроме того выясняется, что в ряде случаев именно это состояние с флуктуирующей третичной структурой имеет функциональное значение, подтверждая гипотезу, выдвинутую в 1988 году [96, 97], и продолженную в многочисленных публикациях по «нативно-неупорядоченным» белкам (см., например, [98–101]), многие из которых проявляют свойства МГ в физиологических условиях. Функциональная специфичность нативно-неупорядоченных белков проявляется, в основном, в механизме их взаимодействия с лигандами.

а) Было обнаружено, что некоторые белки в состоянии МГ могут, после совместного процесса сворачивания и связывания субстрата, осуществлять эффективный катализ. В работе группы Hilvert [102]

была получена мономерная хоризмат мутаза (mCM), путем введения дополнительной петли в димер этого фермента. Ее структура была изучена быстрым Н/D обменом, масс-спектроскопией, КД и ЯМР-спектроскопией, а также связыванием ANS. Оказалось, что у самого по себе этого мономерного фермента структура не жесткая, а имеет свойства MG; но он оказался высокоактивным. При связывании субстрата MG-структура этой mCM превращается в плотно упакованную по многим параметрам. Эта структура была изучена 3D-ЯМР [103]. Изучение термодинамики этого «MG-фермента» и кинетики его взаимодействия с лигандом показало, что у него процесс связывания и освобождения лиганда происходит много быстрее, чем у природного димерного фермента [104].

Опираясь на полученные данные, авторы считают, что состояние расплавленной глобулы может быть привлекательным для создания новых катализаторов.

б) Связывание лиганда с частично развернутым белком было обнаружено для DHFR из *E. coli* [105]. Авторы изучали связывание NADP⁺ (функционального лиганда) с DHFR и показали, что частично развернутая форма фермента связывает субстрат аналогично нативному белку. Было обнаружено также, что DHFR может частично разворачиваться, не теряя при этом лиганда, хотя связывающая способность уменьшается. Основываясь на кристаллической структуре DHFR–NADP⁺ комплекса и результатах по определению свободной энергии для частичного разворачивания DHFR при разных концентрациях NADP⁺, авторы предположили, что аденин-связывающий домен остается структурированным в частично развернутой форме белка и способен связывать адениновую часть субстрата.

в) Другим интересным примером является убиквитин. Этот белок участвует во многих клеточных процессах, начиная с клеточной деградации и включая восстановление ДНК и перестройку хроматина [106]. Это требует определенной пластичности структуры. Было показано, что при давлении 3 кбар нативная структура убиквитина претерпевает переход в промежуточное состояние со свойствами, сходными с MG. Изучение разных мутантных форм методами NOE, ¹⁵N спиновой релаксацией, HSQC, ¹⁵N-¹H-методами ЯМР, показало, что замена Q41N приводит к сходным изменениям в структуре убиквитина. Но наиболее интересно, что подобное структурное изменение наблюдается в убиквитине при связывании с E₂-убиквитинирующим ферментом [106]. Функциональная роль промежуточного состояния типа MG важна не только для E₂-убиквитинирующего фермента, но и для других модифицирующих белков, участвующих в реакциях E₁–E₂–E₃ каскада [106].

г) Кроме рассмотренного ранее фермента mСМ следует отметить связывание лигандов периплазматическими белками, транспортирующими специфические лиганды: Leu, Pe, мальтозу и рибозу [107]. Эти белки-переносчики связывают свои лиганды как в нативном состоянии, так и в состоянии типа расплавленной глобулы, наблюдаемой при низком рН (рН 3–4), хотя эффективность связывания уменьшается. Эти состояния стабилизируются только гидрофобными взаимодействиями, водородными связями и специфической упаковкой при отсутствии протетических групп. Возможно, это объясняется необходимостью претерпевать транслокацию через мембрану. Промежуточное состояние мальтозу-связывающего белка связывается с шапероном SecB. Связывание лигандов в этих транспортных белках вовлекает остатки, достаточно удаленные в пространстве. Поэтому связывание лигандов этими белками в состоянии расплавленной глобулы возможно, если в этом состоянии сохраняется нативо-подобная топология [107].

д) Интересные данные были получены при исследовании сворачивания синтезированного на рибосоме фрагмента 1–121 стафилококковой нуклеазы (SNR121) [108]. Он обнаружил все свойства MG, а меньшие и большие фрагменты – нет. Авторы сделали вывод, что процесс сворачивания этого белка идет последовательно, начиная с аккумуляции вторичной структуры, появления разных структурированных состояний, и заканчивая появлением нативной структуры, и что постоянное подстраивание конформации необходимо для правильного сворачивания и активной экспрессии белка.

ПРОЯВЛЕНИЕ РАСПЛАВЛЕННОЙ ГЛОБУЛЫ В РАЗНЫХ СИСТЕМАХ

а) При изучении вируса кори (Measles Virus) был обнаружен и структурно охарактеризован интермедиат в сворачивании 10-го домена фосфобелка Р этого вируса. [109]. Изучение мутантных форм этого белка показало, что одни из них сворачиваются как 2-state белки, а другие – через интермедиаты с нативоподобной α -спиральной структурой, находящиеся на пути сворачивания в нативную структуру белка.

б) Промежуточное состояние типа MG было обнаружено методами ЯМР в ДНК-связывающем домене белка р53 при его взаимодействии с шапероном Hsp90. В этом комплексе наблюдается интенсивный H/D обмен, тогда как в растворе протоны самого по себе белка р53 обмениваются слабо, а Hsp90 имеет H/D обмен лишь в полости связывания [110].

в) Чтобы разобраться в процессе, приводящем к появлению катаракты, было изучено разворачивание мочевиной V75D мутанта

γ D-кристаллина; именно этот мутант участвует в образовании катаракты [111]. Комбинацией методов ЯМР и SAXS было показано, что при 4.2 М мочевины этот мутантный белок находится в промежуточном состоянии, где С-концевой домен достаточно структурирован, а N-концевой домен не имеет определённой структуры. Авторы предполагают, что подобные состояния могут вносить свой вклад в образование ранней катаракты также и при физиологических условиях.

г) Состояние расплавленной глобулы наблюдалось для $[3\text{Fe}4\text{S}][4\text{Fe}4\text{S}]$ ферридоксина при нагревании при pH 2.5. Это ведет к потере Zn^{2+} и образованию апо-ферридоксина, для которого обнаружено состояние MG при охлаждении [112]. Авторы полагают, что образование MG в апо-белке может иметь физиологическое значение, поскольку его гибкость может способствовать включению металлического центра $[3\text{Fe}4\text{S}][4\text{Fe}4\text{S}]$ в структуру апо-белка.

д) Следующим примером является одна из α -галактозидаз, широко распространенного фермента, катализирующего гидролиз галактозы. Этот фермент применяется при лечении болезни Фарби и эффективен при конвертации группы крови «Б» в «О» группу. Он применяется также для трансгликозилирования и обратимости гидролитических реакций. Для бобовой α -галактозидазы было показано [113], что при pH 2 она переходит в состояние со свойствами MG, сохраняя вторичную структуру и экранированный остаток Thr. Потеря активности связана с нарушением вторичной структуры. Этот фермент сохраняет активность в широкой области значений денатурантов. Поэтому изучение процесса сворачивания этого фермента имеет целью создание рекомбинантного белка-фермента с улучшенной стабильностью для биотехнологического применения.

е) Теперь рассмотрим два примера, когда в сворачивании белков, считавшихся 2-state белками, дальнейшими исследованиями был обнаружен интермедиат; это – ацил-CoA связывающий белок и SH_3 домен P13 киназы.

Ацил-CoA связывающий белок. Используя усовершенствованную технику непрерывного потока (мертвое время 70 μs) для измерений Thr флуоресценции, было показано, что при сворачивании ацил-CoA, регистрированного FRET, через 100 μs обнаруживалось сильное возрастание миграции энергии. Это свидетельствовало о появлении нового, не обнаруженного ранее частично-свернутого промежуточного состояния, в котором примерно 1/3 доступной растворителю поверхности цепи была погружена внутрь структуры [114].

SH3 домен P13 киназы. Сворачивание/разворачивание этого белка, который ранее был использован для изучения переходных

состояний как 2-state белок, было изучено комбинацией Н/D обмена и электроспрей-масс-спектрометрии [115]. Но позднее было обнаружено, что, при разворачивании его гуанидин гидрохлоридом, сначала появляется интермедиат с 5-ю обменными амидными протонами, а далее уже обмениваются оставшиеся необменными 14 протонов. При сворачивании наблюдается обратная картина.

ж) И, в заключение этой части – об интересных случаях появления промежуточных состояний – рассмотрим лизоцим фага Т4, состоящий из двух доменов – N- и C-концевых. Для последнего, кроме уже известного, был обнаружен еще один, невидимый (hidden) в обычных кинетических измерениях, интермедиат. Равновесное разворачивание этого белка мочевиной показало, что наблюдаемый интермедиат состоит из неструктурированного N-домена и структурированного C-домена. С другой стороны, кинетическое исследование Н/D обмена обнаружило интермедиат, где структура нарушена в обоих доменах [116]. Для разрешения этого противоречия было предпринято изучение кинетики сворачивания и разворачивания этого белка. Для различных мутантов были получены шевронные графики, которые имели загибы на обеих ветвях шеврона. Тщательный анализ данных по Н/D обмену позволил выявить наличие двух интермедиатов, по одному с каждой стороны от главного переходного состояния, что адекватно объясняло экспериментальные данные. Обнаруженный интермедиат структурирован только C-доменом. Его назвали «невидимым», так как его нельзя обычно обнаружить кинетическими методами. Но, как видим, для лизоцима Т4 обнаружить этот интермедиат удалось и кинетическими методами. Это является значительным шагом в более полном понимании роли интермедиатов, наблюдаемых по обе стороны от барьера переходного состояния, в сворачивании белков [116].

VI. РЕШЕНИЕ ПАРАДОКСА ЛЕВИНТАЛЯ

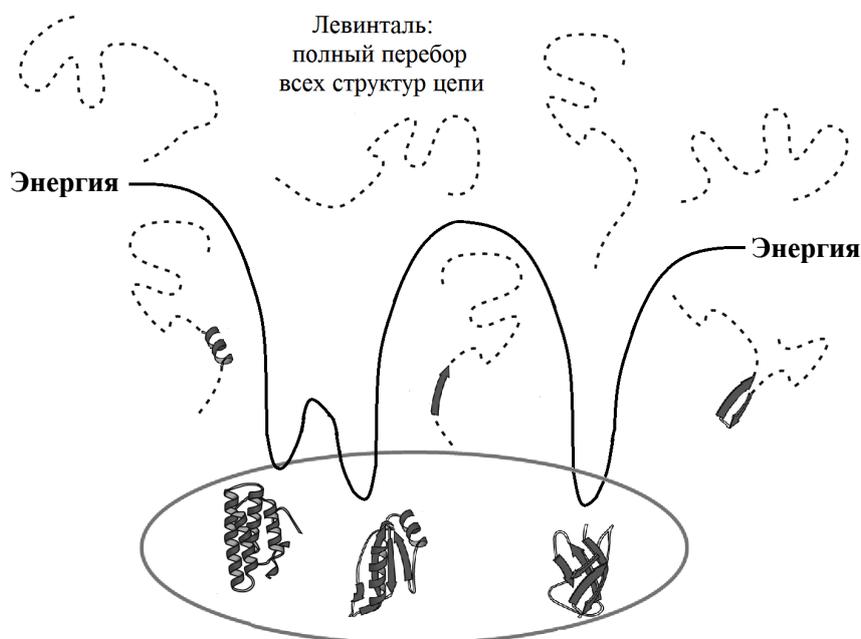
Несмотря на очень большой успех в изучении промежуточных состояний в сворачивании белков, все-таки оставался нерешенным вопрос, связанный с парадоксом Левинтала: как белковая цепь находит за малое, отпущенное ей биологией, время свою нативную структуру из громадного числа возможных вариантов. Было много попыток объяснить – или отвергнуть – этот парадокс (сыгравший, по меткому выражению Шахновича, «роль Великой теоремы Ферма для белковой науки»), но результаты давали только намеки на способ решения парадокса, но не его решение как таковое. Поскольку анализу этих результатов посвящено несколько недавних книг и обзоров, вышед-

ших из нашей лаборатории [117–121] (последний из этих обзоров к тому же помещен в данном выпуске «Биохимии»), мы позволим себе не останавливаться на них подробно, и описать (только в самых общих чертах) полученное, наконец, решение.

Теоретическую оценку времени, достаточного для нахождения самой стабильной структуры белковой цепи из громадного числа возможных вариантов удалось получить, подойдя к проблеме Левинталя «с другой стороны» – выделив оптимальный путь сворачивания белка, рассмотрев оптимальный путь его *разворачивания* [122–124]. Теория не использовала других данных, кроме двух, взятых из опыта, величин – времени перехода а.к. остатка из одной конформации в другую (~10 наносекунд) и средней энергии перехода а.к. остатка из развернутой цепи в белковую глобулу (≈ 5 кДж/моль). Анализ таких путей позволил оценить высоту свободно-энергетического барьера для сворачивания белка и, таким образом, очертить ту область времён, которая теоретически разрешена для сворачивания однодоменных глобулярных белков любого размера и любой стабильности нативного состояния. Оказалось, что все белки, время сворачивания которых было измерено и при физиологических условиях, и в ключевом районе равновесия нативного и денатурированного состояний (а таких белков уже более сотни), попадают в «золотой» треугольник в координатах размер белка – логарифм скорости его сворачивания [124]. Эта область разрешена теоретически (и подтверждена экспериментально) в равной степени как для 2-state, так и для multi-state белков. При этом (опять-таки в согласии с опытом) размер самоорганизующегося белкового домена ограничивается ≈ 500 а.к. остатками. Более длинные последовательности должны делиться на домены. Теория показывает также, что сворачивание белков из менее чем ≈ 80 –100 а.к. остатков находится под полным термодинамическим контролем, а сворачивание более крупных белков – скорее под кинетическим, так как оно должно дать не только стабильную структуру, но и уложиться в «биологически-разумное» время.

Итак, зависимость диапазона возможных времен сворачивания белковых цепей от их длины (от $\sim \exp(0.5L^{2/3})$ нс до $\sim \exp(1.5L^{2/3})$ нс) была получена [122, 123], и парадокс Левинталя был решен в принципе. Однако это решение было получено в терминах энергии и времен, а не в терминах величины перебора структур белковой цепи, необходимого для выделения самой стабильной из них, т.е. *не* в терминах самого парадокса Левинталя.

Решение в терминах величины необходимого перебора было получено лишь недавно [119–121, 125] (хотя, казалось бы, ничто не мешало



Перебор лишь компактных, т.е. стабильных структур цепи

Рис. 6. Решение парадокса Левинталя «в терминах Левинталя» было получено на уровне полного перебора всех глубоких энергетических минимумов, т.е. не всех вообще структур цепи, а лишь всех вариантов компактных ансамблей вторичных структур.

Птицыну и Финкельштейну сделать это еще 40 или даже 45 лет назад – когда они работали над статьями [22], [1]). Для этого величина перебора была оценена *не* на уровне *всех вообще* конформаций цепи (как то делал Левинталь), а на уровне лишь полного перебора всех глубоких энергетических минимумов, т.е. *лишь* всех вариантов компактных (глобулярных, рис. 6) ансамблей вторичных структур (рассмотренных еще в работе [1]). Она оказалась примерно (по порядку величины) равной L^N , где L – число а.к. остатков в белке, а N – число элементов вторичной структуры в нем. В результате, для цепи из $L \approx 80-100$ а.к. остатков (включающей обычно $N \approx 4-6$ участков вторичной структуры) перебор ограничен $\sim 10^{10}$ вариантами (а не $\sim 10^{100}$ вариантами, как у Левинталя); на такой перебор потребуются лишь минуты, максимум часы, а вовсе не время жизни вселенной.

Таким образом было получено полное решение парадокса Левинталя.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог выше изложенному, можно сказать, что гипотеза О.Б. Птицына получила свое экспериментальное подтверждение. Процесс сворачивания белка происходит согласно информации, записанной в его первичной структуре (причем, согласно современным данным [126, 127], ход сворачивания *in vivo*, по крайней мере, для небольших белков, весьма похож на ход сворачивания *in vitro*). В ходе сворачивания первоначально развернутой белковой цепи в ней образуются элементы вторичной структуры, обусловленные локальными и поддержанные дальними взаимодействиями. Образование вторичной структуры резко уменьшает конформационное пространство, приводя к компактизации цепи и образованию флуктуирующей третичной структуры. Это, в свою очередь, обеспечивает выбор правильной топологии, также заложенной в аминокислотной последовательности и обеспечиваемой связанностью всех элементов вторичной структуры единой цепью. Сохранение флуктуирующей третичной структуры промежуточного состояния в сворачивании (расплавленной глобулы) в течение какого-то времени облегчает возможность правильной укладки элементов вторичной структуры и их взаимной подстройки. Длительность этого процесса зависит от длины цепи и – порой – от необходимости взаимодействия с другими участниками процесса. А уже после этой подстройки третичной структуры, стабилизированной – порой – образованием S–S связей, присоединением кофакторов или других стабилизирующих систем, белки приобретают свою функциональную третичную структуру в нужном месте и в нужное время.

Благодарности

Авторы приносят свои извинения коллегам, чьи работы не были цитированы в этой статье ввиду ограниченности ее объема.

ЛИТЕРАТУРА

1. Птицын О.Б. (1973) Стадийный механизм самоорганизации белковых молекул, *Докл. Акад. Наук СССР*, **210**, 1213–1215.
2. Anfinsen, C.B., Haber, E., Sela, M., White, F.H., Jr. (1961) The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **47**, 1309–1314.
3. Gutte, B., and Merrifield, R.B. (1969) The total synthesis of an enzyme with ribonuclease A activity. *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 501–502.
4. Levinthal, C. (1969). How to fold graciously. In *Mössbauer Spectroscopy in Biological Systems: Proceedings of a meeting held at Allerton House, Monticello, Illinois* (Debrunner, P., Tsibris, J.C.M., and Munck, E., eds.). University of Illinois Press, Urbana-Champaign, IL, pp. 22–24.
5. Ptitsyn, O.B. (1995) Molten globule and protein folding, *Adv. Protein Chem.*, **47**, 83–229.
6. Dobson, C.M. (1995) Finding the right fold, *Struct. Biol.* **2**, 513–517.
7. Creighton, T.E. (1997) Protein folding: Does diffusion determine the folding rate?, *Curr. Biol.*, **7**, R380–R383.
8. Dobson, C.M., Karplus, M. (1999) The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 92–101.
9. Baldwin, R.L., Rose, G.D. (1999) Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states, *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 77–83.
10. Arai, M., Kuwajima, K. (2000) Role of the molten globule state in protein folding, *Adv. Prot. Chem.*, **53**, 209–282.
11. Sanchez, I.E., Kiefhaber, T. (2003) Evidence for sequential barriers and obligatory intermediates in apparent two-state protein folding, *J. Mol. Biol.*, **325**, 367–376.
12. Sinha, K.K., Udgaonkar, J.B. (2009) Early events in protein folding, *Curr. Sci.*, **96**, 1053–1070.
13. Baldwin, R.L., Frieden, C., Rose, G.D. (2010) Dry molten globule intermediates and the mechanism of protein unfolding, *Proteins*, **78**, 2725–2737.
14. Jha, S.K., Udgaonkar, J.B. (2010) Direct evidence for a dry molten globule intermediate during the unfolding of a small protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 12289–12294.
15. Baldwin, R.L., Rose, G.D. (2013) Molten globules, entropy-driven conformational change and protein folding, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **23**, 4–10.
16. Camilloni, C., Bonetti, D., Morrone, A., Giri, R., Dobson, C.M., Brunori, M., Gianni, S., Vendruscolo, M. (2016) Towards a structural biology of the hydrophobic effect in protein folding, *Scient. Rep.*, **6**:28285, 1–9.
17. Nishimura, C. (2017) Folding of apomyoglobin: analysis of transient intermediate structure during refolding using quick hydrogen deuterium exchange and NMR, *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, **93**, 10–27.
18. Ptitsyn, O.B., Lim, V.I., Finkelstein, A.V. (1972) Secondary structure of globular proteins and principle of concordance of local and long-range interactions, «*Analysis and simulation of biochemical systems*» (B. Hess and H.C. Hemker, eds) (Proc. VIII FEBS Meeting). North Holland Publishing Company, Amsterdam, **25**, 421–431.
19. Птицын О.Б., Финкельштейн А.В. (1970) Связь вторичной структуры глобулярных белков с их первичной структурой, *Биофизика*, **15**, 757–768.

20. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. (1978) Теория самоорганизации вторичной структуры белков: зависимость структуры нативной глобулы от вторичной структуры развернутой цепи, *Докл. АН СССР*, **242**, 1226–1228.
21. Ptitsyn, O.B., Finkelstein, A.V. (1979) Mechanism of protein folding, *Int. J. Quant. Chem.*, **16**, 407–418.
22. Ptitsyn, O.B., Finkelstein, A.V. (1980) Similarities of protein topologies: Evolutionary divergence, functional convergence or principles of folding?, *Quart. Rev. Biophys.*, **79**, 137–138.
23. Птицын О.Б., Финкельштейн А.В. (1981) Направленный механизм самоорганизации белков, обобщенная модель, *Кристаллография*, **26**, 1066–1073.
24. Ptitsyn, O.B., Finkelstein, A.V. (1983) Theory of protein secondary structure and algorithm of its prediction, *Biopolymers*, **22**, 15–25.
25. Ptitsyn, O.B. (1992) Secondary structure formation and stability, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2**, 13–20.
26. Finkelstein, A.V., Badretdinov, A.Ya., Gutin, A.M. (1995) Why do protein architectures have a Boltzmann-like statistics?, *Proteins*, **23**, 142–150.
27. Holthauzen, L.M., Rosgen, J., Bolen, D.W. (2010) Hydrogen bonding progressively strengthens upon transfer of the protein urea-denatured state to water and protecting osmolytes, *Biochemistry*, **49**, 1310–1318.
28. Auton, M., Rosgen, J., Sinev, M., Holthauzen, L.M., Bolen, D.W. (2011) Osmolyte effects on protein stability and solubility: a balancing act between backbone and side-chains, *Biophys. Chem.*, **159**, 90–99.
29. Kuwajima, K., Yamaya, H., Sugai, S. (1996) The burst-phase intermediate in the refolding of beta-lactoglobulin studied by stopped-flow circular dichroism and absorption spectroscopy, *J. Mol. Biol.*, **264**, 806–822.
30. Sakurai, K., Fujioka, S., Konuma, T., Yagi, M., Goto, Y. (2011) A circumventing role for the non-native intermediate in the folding of beta-lactoglobulin, *Biochemistry*, **50**, 6498–6507.
31. Matsumura, Y., Shinjo, M., Kim, S.J., Okishio, N., Gruebele, M., Kihara, H. (2013) Transient helical structure during PI3K and Fyn SH3 domain folding, *J. Phys. Chem. B*, **117**, 4836–4843.
32. Konuma, T., Sakurai, K., Yagi, M., Goto, Y., Fujisawa, T., Takahashi, S. (2015) Highly collapsed conformation of the initial folding intermediates of beta-lactoglobulin with non-native α -helix, *J. Mol. Biol.*, **427**, 3158–3165.
33. Ptitsyn, O.B. (1981) Protein folding: General physical model, *FEBS Lett.*, **131**, 197–202.
34. Ptitsyn, O.B. (1987) Protein folding: hypotheses and experiments, *J. Protein Chem.*, **6**, 273–293.
35. Ptitsyn, O.B. (1991) How does protein synthesis give rise to the 3D-structure?, *FEBS Lett.*, **285**, 176–181.
36. Dolgikh, D.A., Gilmanshin, R.I., Brazhnikov, E.V., Bychkova, V.E., Semisotnov, G.V., Veniaminov, S.Yu., Ptitsyn, O.B. (1981) α -Lactalbumin: Compact state with fluctuating tertiary structure?, *FEBS Lett.*, **136**, 311–315.
37. Ohgushi, M., Wada, A. (1983) 'Molten-globule state': a compact form of globular proteins with mobile side chains, *FEBS Lett.* **164**, 21–24.
38. Ptitsyn, O.B. (1992) The molten globule state. In *Protein Folding* (Creighton, T.E., ed) W.H. Freeman and Company, New York, pp. 243–300.
39. Dolgikh, D.A., Abaturov, L.V., Boltina, I.A., Brazhnikov, E.V., Bych-

- kova, V.E., Bushuev, V.N., Gilman-shin, R.I., Lebedev, Yu.O., Semisotnov, G.V., Tiktopulo, E.I., Ptitsyn, O.B. (1985) Compact state of a protein molecule with pronounced small-scale mobility: bovine α -lactalbumin, *Eur. Biophys. J.*, **13**, 109–121.
40. Ptitsyn, O.B. (1994) Kinetic and equilibrium intermediates in protein folding, *Protein Eng.*, **7**, 593–596.
41. Ptitsyn, O.B., Semisotnov, G.V. (1991) The mechanism of protein folding. In: «Conformations and forces in Protein Folding» (B.T. Nall and K.A. Dill, eds), pp. 155–168. Am. Assoc. Adv. Sci., Washington, D. C.
42. Gilmanshin, R.I., Ptitsyn, O.B. (1987) An early intermediate of refolding α -lactalbumin forms within 20ms, *FEBS Lett.*, **223**, 327–329.
43. Semisotnov, G.V., Rodionova, N.A., Kutysenko, V.P., Ebert, B., Blanck, J., Ptitsyn, O.B. (1987) Sequential mechanism of refolding of carbonic anhydrase B, *FEBS Lett.*, **224**, 9–13.
44. Ptitsyn, O.B., Pain, R.H., Semisotnov, G.V., Zerovnik, E., Razgulyaev, O.I. (1990) Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding, *FEBS Lett.*, **262**, 20–24.
45. Ptitsyn O.B. (1997) Structures of folding intermediates, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **5**, 74–78.
46. Semisotnov, G.V., Rodionova, N.A., Razgulyaev, O.I., Uversky, V.N., Gripas, A.F., Gilmanshin, R.I. (1991) Study of the 'molten globule' intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe, *Biopolymers*, **31**, 119–128.
47. Forge, V., Wijesinha, R.T., Balbach, J., Brew, K., Robinson, C.V., Redfield, C., Dobson, C.M. (1999) Rapid collapse and slow structural reorganization during the refolding of bovine α -lactalbumin, *J. Mol. Biol.*, **288**, 673–688.
48. Magg, C., Kubelka, J., Holtermann, G., Haas, E., Schmid, F.X. (2006) Specificity of the initial collapse in the folding of the cold shock protein, *J. Mol. Biol.*, **360**, 1067–1080.
49. Kamagata, K., Arai, M., Kuwajima, K. (2004) Unification of the folding mechanisms of non-two-state and two-state proteins, *J. Mol. Biol.*, **339**, 951–965.
50. Kamagata, K., Kuwajima, K. (2006) Surprisingly high correlation between early and late stages in non-two-state protein folding, *J. Mol. Biol.*, **357**, 1647–1654.
51. Jackson, S.E. (1998) How do small single-domain proteins fold?, *Fold. Des.*, **3**, R81–R91.
52. Galzitskaya, O.V., Garbuzynskiy, S.O., Ivankov, D.N., Finkelstein, A.V. (2003) Chain length is the main determinant of the folding rate for proteins with three-state folding kinetics. *Proteins*, **51**, 162–166.
53. Plaxco, K.W., Simons, K.T., Baker, D. (1998) Contact order, transition state placement and the refolding rates of single domain proteins. *J. Mol. Biol.* **277**, 985–994.
54. Ivankov, D.N., Garbuzynskiy, S.O., Alm, E., Plaxco, K.W., Baker, D., Finkelstein, A.V. (2003) Contact Order Revisited: Influence of protein size on the folding rate. *Protein Sci.*, **12**, 2057–2062.
55. Privalov, P.L. (1979) Stability of proteins: small globular proteins. *Adv. Protein Chem.*, **33**, 167–241.
56. Khorsanizadeh, S., Peters, I.D., Roder, H. (1996) Evidence for a three-state model of protein folding from kinetic analysis of ubiquitin variants with altered core residues, *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 193–205.
57. Bachmann, A., Kiefhaber, T. (2001) Apparent two-state tendamistat folding is a sequential process along a defined route. *J. Mol. Biol.*, **306**, 375–386.

58. Houliston, R.S., Liu, C., Singh, L.M., Meiering, E.M. (2002) pH and urea dependence of amide hydrogen-deuterium exchange rates in the beta-trefoil protein hisactophilin, *Biochemistry*, **41**, 1182–1194.
59. Park, S.H., Shastry, M.C., Roder, H. (1999) Folding dynamics of the B1 domain of protein G explored by ultrarapid mixing, *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 943–947.
60. Gorski, S.A., Capaldi, A.P., Kleanthous, C., Radford, S.E. (2001) Acidic conditions stabilize intermediates populated during the folding of Im7 and Im9, *J. Mol. Biol.*, **312**, 849–863.
61. Jager, M., Nguyen, H., Crane, J.C., Kelly, J.W., Gruebele, M. (2001) The folding mechanism of a beta-sheet: the WW domain, *J. Mol. Biol.*, **311**, 373–393.
62. Jager, M., Deechongkit, S., Koepf, E.K., Nguyen, H., Gao, J., Powers, E.T., Gruebele, M., Kelly, J.W. (2008) Understanding the mechanism of beta-sheet folding from a chemical and biological perspective, *Biopolymers*, **90**, 751–758.
63. Wagner, C., Kiefhaber, T. (1999) Intermediates can accelerate protein folding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6716–6721.
64. Балобанов В.А., Катина Н.С., Финкельштейн А.В., Бычкова В.Е. (2017) Промежуточные состояния апомиоглобина – части одной области диаграммы конформационных состояний? *Биохимия (Москва)*, **82**, 832–840.
65. Шахнович Е.И., Финкельштейн А.В. (1982) К теории кооперативных переходов в белках. *Докл. АН СССР*, **267**, 1247–1250.
66. Shakhnovich, E.I., Finkelstein, A.V. (1989) Theory of cooperative transitions in protein molecules. I. Why denaturation of globular proteins is a first-order phase transition, *Biopolymers*, **28**, 1667–1680.
67. Finkelstein, A.V., Shakhnovich, E. (1989) Theory of cooperative transitions in protein molecules. II. Phase diagram for a protein molecule in solution, *Biopolymers*, **28**, 1681–1694.
68. Kharakoz, D. P., Bychkova, V. E. (1997) Molten globule of human alpha-lactalbumin: hydration, density, and compressibility of the interior, *Biochemistry*, **36**, 1882–1890.
69. Kiefhaber, T., Labhardt, A.M., Baldwin, R.L. (1995) Direct NMR evidence for an intermediate preceding the rate-limiting step in the unfolding of ribonuclease A, *Nature*, **375**, 513–515.
70. Jha, S.K., Udgaonkar, J.B. (2009) Direct evidence for a dry molten globule intermediate during the unfolding of a small protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 12289–12294.
71. Hoeltzli, S.D., Frieden, C. (1995) Stopped-flow NMR spectroscopy: Real-time unfolding studies of 6-¹⁹F-tryptophan-labeled *Escherichia coli* dihydrofolate reductase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9318–9322.
72. Reiner, A., Henklein, P., Kiefhaber, T. (2010) An unlocking/relocking barrier in conformational fluctuations of villin headpiece subdomain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 4955–4960.
73. Acharya, N., Mishra, P., Jha, S.K. (2016) Evidence for dry molten globule-like domains in the pH-induced equilibrium folding intermediate of a multidomain protein, *J. Phys. Chem. Lett.*, **7**, 173–179.
74. Sarkar, S.S., Udgaonkar, J.B., Krishnamoorthy, G. (2013) Unfolding of a small protein proceeds via dry and wet globules and a solvated transition state, *Biophys. J.*, **105**, 2392–2402.
75. Kuwajima, K. (1996) The molten globule state of alpha-lactalbumin, *FASEB J.*, **10**, 102–109.
76. Wu, L.C., Schulman, B.A., Peng, Z., Kim, P.S. (1996) Disulfide deter-

- minants of calcium-induced packing in α -lactalbumin, *Biochemistry*, **35**, 859–863.
77. Quezada, C.M., Schulman, B.A., Froggatt, J.J., Dobson, C.M., Redfield, C. (2004) Local and global cooperativity in human α -lactalbumin molten globule, *J. Mol. Biol.*, **338**, 149–158.
78. Polverino de Laureto, P., Frare, E., Gottardo, R., Fontana, A. (2002) Molten globule of bovine α -lactalbumin at neutral pH induced by heat, trifluoroethanol, and oleic acid: a comparative analysis by circular dichroism spectroscopy and limited proteolysis, *Proteins*, **49**, 385–397.
79. Mok, K.H., Nagashima, T., Day, I.J., Hore, P.J., Dobson, C.M. (2005) Multiple subsets of side-chain packing in partially folded states of α -lactalbumins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 8899–8904.
80. Blanch, I.W., Morozova-Roche, L.A., Hecht, L., Noppe, W., Barron, L.D. (2000) Raman optical activity characterization of native and molten globule states of equine lysozyme: comparison with hen lysozyme and bovine α -lactalbumin, *Biopolymers (Biospectroscopy)* **57**, 235–248.
81. Лим В.И. (1975) Структурные переходы в белковой цепи при образовании нативных глобул. Гипотеза «избыточных» спиралей. *Доклады АН СССР*, **222**, 1467–1469.
82. Chow, C.C., Chow, C., Raghunathan, V., Huppert, T.J., Kimball, E.B., Cavagnero, S. (2003) Chain length dependence of apomyoglobin folding: Structural evolution from misfolded sheets to native helices, *Biochemistry*, **42**, 7090–7099.
83. Cavagnero, S., Nishimura, C., Schwarzingler, S., Dyson, H.J., Wright, P.E. (2001) Conformational and dynamic characterization of the molten globule state of an apomyoglobin mutant with an altered folding pathway, *Biochemistry*, **40**, 14459–14467.
84. Uzawa, T., Akiyama, S., Kimura, T., Takahashi, S., Ishimori, K., Morishima, I., Fujisawa, T. (2004) Collapse and search dynamics of apomyoglobin folding revealed by submillisecond observations of α -helical content and compactness, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 1171–1176.
85. Uzawa, T., Nishimura, C., Akiyama, S., Ishimori, K., Takahashi, S., Dyson, H.J., Wright, P.E. (2008) Hierarchical folding mechanism of apomyoglobin revealed by ultrafast H/D exchange coupled with 2D NMR, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13859–13864.
86. Felitsky, D.J., Lietzow, M.A., Dyson, H.J., Wright, P.E. (2008) Modeling transient collapsed states of an unfolded protein to provide insights into early folding events, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 6278–6283.
87. Meinhold, D.W., Wright, P.E. (2011) Measurements of protein unfolding/refolding kinetics and structural characterization of hidden intermediates by NMR relaxation dispersion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 9078–9083.
88. Armstrong, B.D., Choi, J., Lopez, C., Wesener, D.A., Hubbell, W., Cavagnero, S., Han, S. (2011) Site-specific hydration dynamics in the nonpolar core of a molten globule by dynamic nuclear polarization of water, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 5987–5995.
89. Ptitsyn, O.B., Ting, K.-L.H. (1999) Non-functional conserved residues in globins and their possible role as a folding nucleus, *J. Mol. Biol.*, **291**, 671–677.
90. Galzitskaya, O.V., Finkelstein, A.V. (1999) A theoretical search for folding/unfolding nuclei in three-dimensional protein structures, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 11299–11304.
91. Garbuzynskiy, S.A., Finkelstein, A.V., Galzitskaya, O.V. (2005) On

- the prediction of folding nuclei in globular proteins, *Mol. Biol. (Moscow)*, **39**, 1032–1041.
92. Fersht, A. (1999) *Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding*. Гл. 2, 15, 18, 19. W.H. Freeman & Co, N.Y.
 93. Baryshnikova, E.N., Melnik, B.S., Finkelstein, A.V., Semisotnov, G.V., Bychkova, V.E. (2005) Three-state protein folding: experimental determination of free-energy profile, *Protein Sci.*, **14**, 2658–2667.
 94. Samatova, E.N., Katina, N.S., Balobanov, V.A., Melnik, B.S., Bychkova, V.E., Finkelstein, A.V. (2009). How strong are side chain interactions in the folding intermediate?, *Protein Sci.*, **18**, 2152–2159.
 95. Samatova, E.N., Melnik, B.S., Balobanov, V.A., Katina, N.S., Dolgikh, D.A., Semisotnov, G.V., Finkelstein, A.V. Bychkova, V.E., (2010). Folding intermediate and folding nucleus for I->N and U->I->N transitions in apomyoglobin: Contributions by conserved and non-conserved residues, *Biophys. J.*, **98**, 1694–1702.
 96. Bychkova, V.E., Pain, R.H., Ptitsyn, O.B. (1988) The ‘molten globule’ state is involved in the translocation of proteins across membranes?, *FEBS Lett.*, **238**, 231–234.
 97. Bychkova, V.E., Ptitsyn, O.B. (1993) The molten globule *in vitro* and *in vivo*, *Chemtracts-Biochem. Mol. Biol.*, **4**, 133–163.
 98. Wright, P. E., Dyson, H. J. (1999) Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J. Mol. Biol.*, **293**, 321–331.
 99. Uversky, V. N., Gillespie, J. R., Fink, A. L. (2000) Why are «natively unfolded» proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins*, **41**, 415–442.
 100. 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., Hipps, 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. Graphics and Modeling*, **19**, 26–59.
 101. Dunker, A. K., Oldfield, C. J., Meng, J., Romero, P., Yang, J. Y., Chen, J. W., Vacic, V., Obradovic, Z., Uversky, V. N. (2008) The unfoldomics decade: an update on intrinsically disordered proteins, *BMC Genomics*, **9**, Suppl. 2, S1.
 102. Vamvaca, K., Voegeli, B., Kast, P., Pervushin, K., Hilvert, D. (2004) An enzymatic molten globule: Efficient coupling of folding and catalysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12860–12864.
 103. Pervushin, K., Vamvaca, K., Voegeli, b., Hilvert, D. (2007) Structure and dynamics of a molten globular enzyme, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 1202–1206.
 104. Vamvaca, K., Jelesarov, I., Hilvert, D. (2008) Kinetics and thermodynamics of ligand binding to a molten globular enzyme and its native counterpart, *J. Mol. Biol.*, **382**, 971–977.
 105. Kasper, J.R., Park, C. (2015) Ligand binding to a high-energy partially unfolded protein, *Protein Sci.*, **24**, 129–137.
 106. Kitazawa, S., Kameda, T., Yagi-Utsumi, M., Sugase, K., Baxter, N.J., Kato, K., Williamson, M.P., Kitahara, R. (2013) Solution structure of the Q41N variant of ubiquitin as a model for alternatively folded N2 state of ubiquitin, *Biochemistry*, **52**, 1874–1885.
 107. Prajapati, R.S., Indu, S., Varadarajan, R. (2007) Identification and thermodynamic characterization of

- molten globule states of periplasmic binding proteins, *Biochemistry*, **46**, 10339–10352.
108. Zhou, B., Tian, K., Jing, G. (2000) An in vitro peptide folding model suggests the presence of the molten globule state during nascent peptide folding, *Protein Eng.*, **13**, 35–39.
109. Bonetti, D., Camilloni, C., Visconti, L., Longhi, S., Brunori, M., Vendruscolo, M., Gianni, S. (2016) Identification and structural characterization of an intermediate in the folding of the measles virus X domain, *J. Biol. Chem.*, **291**, 10886–10892.
110. Park, S.J., Borin, B.N., Martinez-Yamout, M.A., Dyson, H.J. (2011) The client protein p53 forms a molten globule-like state in the presence of Hsp90, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 537–541.
111. Whitley, M.J., Xi, Z., Bartko, J.C., Jensen, M.R., Blackledge, M., Gronenborn, A.M. (2017) A combined NMR and SAXS analysis of the partially folded cataract-associated V75D gamma-D-crystallin, *Biophys. J.*, **112**, 1135–1146.
112. Leal, S.S., Gomes, C.M. (2007) Studies of the molten globule state of ferredoxin: Structural characterization and implications on protein folding and iron-sulfur center assembly, *Proteins*, **68**, 606–616.
113. Singh, N., Kumar, R., Jagannadham, M.V., Kayastha, A.M. (2013) Evidence for a molten globule state in Cicer a-Galactosidase induced by pH, temperature, and guanidine hydrochloride, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **169**, 2315–2325.
114. Teilum, K., Maki, K., Kragelund, B.B., Poulsen, F.M., Roder, H. (2002) Early kinetic intermediate in the folding of acyl-CoA binding protein detected by fluorescence labeling and ultrarapid mixing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9807–9812.
115. Wani, A.H., Udgaonkar, J.B. (2009) Native state dynamics drive the unfolding of the SH3 domain of P13 kinase at high denaturation concentration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 20711–20716.
116. Cellitti, J., Bernstein, R., Marqusee, S. (2007) Exploring subdomain cooperativity in T4 lysozyme II: Uncovering the C-terminal subdomain as a hidden intermediate in the kinetic folding pathway, *Protein Sci.*, **16**, 852–862.
117. Финкельштейн А.В., Птицын О.В. (2012) *Физика белка*. 4-е дополненное издание. Гл. 18–21. Книжный Дом «Университет», М.
118. Финкельштейн А.В. (2014) *Физика белковых молекул*. Гл. 9. АНО «Ижевский институт компьютерных исследований», М.–Ижевск.
119. Finkelstein, A.V., Ptitsyn, O.B. (2016) *Protein Physics. A Course of Lectures*. 2nd Edition. Chs. 7, 10, 13, 18, 19–21. Academic Press, an Imprint of Elsevier Science, Amsterdam • Boston • Heidelberg • London • New York • Oxford • Paris • San Diego • San Francisco • Singapore • Sydney • Tokyo.
120. Finkelstein, A.V., Badretdin, A.J., Galzitskaya, O.V., Ivankov, D.N., Bogatyreva, N.S., Garbuzynskiy, S.O. (2017) There and back again: Two views on the protein folding puzzle, *Phys. Life Rev.*, **20**, doi: 10.1016/j.plrev.2017.01.025. [Epub ahead of print].
121. Финкельштейн А. В. (2018) 50+ лет самоорганизации белков. *Биохимия*, **83(1)** в печати.
122. Финкельштейн А. В., Бадретдинов А. Я. (1997) Физические причины быстрой самоорганизации стабильной пространственной структуры белков: Решение парадокса Левинтала, *Мол. Биол.*, **31**, 469–477.

123. Finkelstein, A.V., Badretdinov, A.Ya. (1997) Rate of protein folding near the point of thermodynamic equilibrium between the coil and the most stable chain fold, *Fold. Des.*, **2**, 115–121.
124. Garbuzinskiy, S.O., Ivankov, D.N., Bogatyreva, N.S., Finkelstein, A.V. (2013) Golden triangle for folding rates of globular proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 147–150.
125. Finkelstein, A.V., Garbuzynskiy, S.O. (2015) Reduction of the search space for the folding of proteins at the level of formation and assembly of secondary structures: A new view on the solution of Levinthal's paradox. *ChemPhysChem*, **16**, 3375–3378.
126. Eichmann, C., Preissler, S., Riek, R., Deuerling, E. (2010) Cotranslational structure acquisition of nascent polypeptides monitored by NMR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 9111–9116.
127. Han, Y., David, A., Liu, B., Magadan, J.G., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., Qian, S.-B. (2012) Monitoring cotranslational protein folding in mammalian cells at codon resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 12467–12472.