

*Автор посвящает этот обзор своим Учителям –
Л. П. Овчинникову и А. С. Спирину.*

БИОСИНТЕТИЧЕСКОЕ СВОРАЧИВАНИЕ БЕЛКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ШАПЕРОНЫ

©2022 г.

А. Н. ФЕДОРОВ

ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

I. Введение. II. Ко-трансляционное сворачивание белков в процессе биосинтеза на рибосоме. III. Ранние стадии сворачивания белка, происходящие ко-трансляционно. IV. Роль рибосомы в сворачивании полипептидных цепей. V. Продвинутое стадии фолдинга растущих полипептидных цепей. VI. Связывание кофакторов и лигандов. VII. Поздние стадии процесса сворачивания и формирование олигомерных структур. VIII. Ферменты, катализирующие сворачивание. IX. Неравномерность скорости трансляции и ко-трансляционное сворачивание. X. Возможные пути биосинтетического сворачивания полипептидных цепей. XI. Молекулярные шапероны в ко-трансляционном сворачивании. XII. Ко-трансляционное сворачивание белков и его физический смысл. XIII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Проблема, каким образом линейная аминокислотная последовательность полипептида сворачивается, чтобы принять уникальную пространственную структуру, является одной из фундаментальных проблем современной науки. Разумеется, физические принципы сворачивания белков одинаковы для сворачивания вновь синтезированных белков в клетках и рефолдинге денатурированных полипептидов. В то же время, проблема сворачивания белков не может быть полностью понята без соотнесения ее с биологическим контекстом, особенно для больших, мультидоменных и мультисубъединичных, белков. Принципиальные особенности сворачивания белков в клетке включают в себя процесс их биосинтеза на рибосомах, наличие молекулярных шаперонов, а также особенности условий, в которых проходят процессы – очень высокие концентрации белков и других биологических макромолекул, что может существенно влиять на фолдинг. Одним из основных различий между биосинтетическим сворачиванием белка и его ренатурацией является ко-трансляционное сворачивание. Основная

Адрес для корреспонденции: a.fedorov@fbras.ru

отличительная черта ко-трансляционного сворачивания – векторное (направленное) появление полипептидной цепи из рибосомы и возможность инициации сворачивания появляющегося растущего полипептида. При этом самым существенным образом может отличаться кинетика процесса сворачивания, его пути и возможное распределение продукта между несколькими формами (например, нативная и агрегированная форма) и их относительный выход. Молекулярные шапероны являются неотъемлемой частью системы обеспечения эффективного сворачивания белков в клетке.

В обзоре будут рассмотрены процессы сворачивания вновь синтезированных белков и участие шаперонов, как во время собственно синтеза, так и на пост-трансляционных этапах, поскольку они входят в единый процесс достижения белками уникальной пространственной структуры. В обзоре также будет рассмотрено, насколько и каким образом все эти элементы общего процесса биосинтетического сворачивания белков могут менять его параметры как физического процесса. В силу ограничений объема обзора некоторые, несомненно, важные аспекты, такие, как возможные следствия высоких концентраций компонентов цитоплазмы клеток на процесс биосинтетического сворачивания белков, анализ пермутированных полипептидов, не рассматривались. При изложении и цитировании материала в обзоре по мере возможности выдерживался подход последовательности ставившихся задач и их решения, что позволяет лучше оценить логику сделанных работ и остающиеся вопросы.

II. КО-ТРАНСЛЯЦИОННОЕ СВРАЧИВАНИЕ БЕЛКОВ В ПРОЦЕССЕ БИОСИНТЕЗА НА РИБОСОМЕ

Синтез белка в клетках работает с поразительной эффективностью. Например, бактериальная клетка *Escherichia coli* использует 20 000 рибосом для производства до 30 000 полипептидов в минуту, при средней скорости удлинения полипептидов от 600 до 1200 остатков на рибосому в минуту. Все белки, а это тысячи различных полипептидных цепей, синтезируемых в клетке, затем должны складываться в большое разнообразие уникальных нативных структур.

Идея, что процесс сворачивания белка может идти параллельно его синтезу, была высказана в начале шестидесятых годов, тогда же началась ее экспериментальная проверка [1–4]. В указанных работах было показано, что при бесклеточном синтезе бета-галактозидазы *E. coli* можно детектировать ферментативную активность фермента в рибосомной фракции. Тщательный анализ подтвердил, что активностью обладает действительно рибосомо-связанный белок в составе

полирибосом [3]. К полученным результатам долгое время было скептическое отношение, когда выяснилось, что бета-галактозидаза является тетрамером и С-концевая часть белка необходима для его активности. Определение трехмерной структуры бета-галактозидазы *E. coli* и имеющаяся сейчас структурно-функциональная информация на самом деле позволяют понять, как такой феномен, как образование активного фермента, найденный авторами вышеприведенных работ, действительно может иметь место.

Ко-трансляционное сворачивание, так же, как и ко-транслокационное сворачивание белков, разделяют основную отличительную черту – векторное (направленное) появление полипептидной цепи из рибосомы или мембраны. Верно, что та же самая конформация, которая приобретает полипептидом в ходе биосинтетического сворачивания в клетке, идентична конформации полноразмерного белка при его рефолдинге из денатурированного состояния. Это следует из множества известных в литературе случаев получения биологически активных, функциональных белков после их ренатурации. Однако идентичность конечной пространственной структуры белка не означает обязательную идентичность путей сворачивания, ведущих к данной структуре [5]. При этом самым существенным образом может отличаться кинетика процесса сворачивания, его пути и возможное распределение продукта между несколькими формами (например, нативная и агрегированная форма) и их относительный выход. Фактически, биологическая функция, которая разделяется всеми белками, это способность сворачиваться в уникальную нативную конформацию. Эффективное выполнение этой функции белками является необходимым условием, прежде чем они могут начать выполнять любые другие биологические функции.

III. РАННИЕ СТАДИИ СВОРАЧИВАНИЯ БЕЛКА, ПРОИСХОДЯЩИЕ КО-ТРАНСЛЯЦИОННО

Сворачивание полипептидов является спонтанным процессом и может в принципе начинаться и проходить по мере синтеза белка, т.е. появления и постепенного удлинения растущей полипептидной цепи до завершения синтеза полноразмерного полипептида. С другой стороны, связь С-конца полипептида с тРНК и фиксация пептидил-тРНК на рибосоме может ограничивать конформационную подвижность растущего полипептида и влиять на сворачивание. Ранний стереохимический анализ показал, что растущий полипептид может покидать пептидил-трансферазный центр рибосомы в конформации α -спирали [6].

По-настоящему революционные изменения возможностей анализа сворачивания растущих полипептидных цепей произошли после определения трехмерной структуры прокариотической и эукариотической рибосом и составных частей аппарата трансляции [7]. Работы по компьютерному моделированию поведения полипептидной цепи в условиях ограничения пространства, как имеет место при выходе синтезированного полипептида из рибосомы, показали, что должна наблюдаться компактизация полипептидов. В работах авторы пришли к выводу о предпочтительном формировании α -спиралей и их стабилизации за счет энтропии в указанных условиях [8, 9].

Разработано несколько экспериментальных стратегий для наблюдения за ко-трансляционным сворачиванием, происходящим в реальном времени, в основном на основе измерений флуоресценции синхронизированных рибосом в объеме [10] или силовой спектроскопии одиночных молекул [11]. Однако идентификация и характеристика различных состояний и переходов между ними является сложной задачей [12]. Еще одним подходом является анализ трансляционно-остановленных полипептидных цепей, чтобы анализировать равновесные состояния ко-трансляционного сворачивания, способного быть достигнутым при фиксированной длине цепи [13,14].

Также был адаптирован целый ряд биохимических методов, с использованием формирования дисульфидной связи, протеолиза, ковалентных модификаций [15–21]. Структурные методы, такие как криоэлектронная микроскопия, одномолекулярная силовая спектроскопия, ЯМР-спектроскопия, также дают информацию о полипептидных цепях в выходном туннеле рибосомы, включая кинетику сворачивания и влияние рибосомы на ход процесса [15, 17, 18, 22–25].

Растущие полипептидные цепи ряда белков начинают частично складываться уже внутри рибосомы [17, 19, 26]. При этом вторичная структура, такая как α -спирали, может формироваться в пределах выходного туннеля рибосомы [27], приобретение же элементов пространственной структуры начинается по мере выхода цепи из рибосомы [28, 29]. Последнее совсем не удивительно, поскольку выходной туннель рибосомы накладывает стерические ограничения на компактизацию полипептида.

IV. РОЛЬ РИБОСОМЫ В СВОРАЧИВАНИИ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ

Поскольку растущий полипептид во все время синтеза все равно связан с рибосомой в виде пептидил-тРНК, локальные взаимодействия как с собственно рибосомой, так и другими компонентами аппарата трансляции, могут влиять на сворачивание вследствие высокой локальной концентрации химических группировок. Теоретический анализ показал возможность стабилизации компактных структур полипептидной цепи [30]. Экспериментальный анализ также показал влияние рибосом на компактность растущих цепей [15, 19, 24, 31, 32]. Естественным образом эффекты рибосомы снижаются при росте длины растущего пептида [20, 24].

Рибосомы *E. coli*, отмытые солевым раствором от ассоциированных белков и других компонентов, активировали рефолдинг денатурированной роданезы. Эффект связан с действием большой 50S субъединицы, а именно 23S рибосомной РНК [33]. Рибосомы способны только на однократное участие в ренатурации роданезы, после чего они становятся (касательно данной способности) инертными. Они могут вновь способствовать рефолдингу роданезы после обработки фактором элонгации EF-G с ГТФ или альфа-сарцином (делающим разрыв в 23S рибосомной РНК в районе связывания факторов элонгации).

Предложена модель, в которой, основываясь на трехмерной структуре большой субъединицы рибосомы, растущий пептид проходит через тоннель длиной около 100 Å между пептидил-трансферазным центром и выходным сайтом. Предполагается, что с одной стороны, минимальный диаметр тоннеля и физические и химические свойства составляющих его компонентов, РНК и белков, должны были бы предотвращать сворачивание растущих пептидов. С другой стороны, рибосома закрывает от протеолиза растущие пептиды различного размера, варьирующего от 32 до 70 аминокислотных остатков. Это может свидетельствовать о сворачивании пептидов внутри тоннеля. Выдвигается предположение, что сворачивание растущих пептидов может начинаться в дистальной части тоннеля недалеко от выходного сайта и протекать на поверхности рибосомы в выемке недалеко от выходного сайта [34]. Результаты недавних работ по компьютерному моделированию подтверждают предположение о компактизации растущего полипептида и образовании α -спиралей внутри выходного тоннеля.

Было показано, что добавление или укорачивание в N- и C-концевых последовательностях белков может существенно влиять на

эффективность их освобождения из комплекса с рибосомами после завершения синтеза. Так, удаление сигнальных последовательностей у роданезы и бета-лактамазы приводило к повышению доли синтезированных полипептидов, освобождаемых из рибосомы [35]. Добавление гидрофобной аминокислоты или 6 остатков гистидина на N-концы тех же белков затрудняло процесс терминации и освобождения полноразмерных полипептидных цепей из рибосом. Также процесс освобождения из рибосом затруднялся при добавлении на C-конец роданезы всего одной гидрофобной аминокислоты. Сходные результаты были получены при анализе синтеза и сворачивания А субъединицы рибцина и его форм с делециями на N- и C-концах [36].

Бактериальный фактор элонгации трансляции EF-Tu может быть способен, подобно шаперонам, участвовать в сворачивании белков [37]. Эффект был наиболее выраженным в присутствии EF-Ts, т.е. в условиях осциллирования EF-Tu между комплексами с ГТФ и ГДФ. Блокирование такого осциллирования (антибиотиками, стабилизирующими одно из состояний, избытком ГДФ или негидролизующим аналогом ГТФ) уничтожало эффект EF-Tu на ренатурацию роданезы. Здесь опять необходимо помнить, что в данном случае мы имеем дело с ситуацией, далекой от природной: ренатурируемый субстратный белок имеет животное происхождение и сворачивается без лидерной последовательности, как это имеет место в животных клетках, фактор элонгации EF-Tu имеет бактериальное происхождение.

V. ПРОДВИНУТЫЕ СТАДИИ ФОЛДИНГА РАСТУЩИХ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ

Ранние стадии ренатурации белков проходят быстро; так, формирование вторичной структуры и компактизация требуют менее одной секунды [38]. Формирование компактных глобулярных интермедиатов может занимать всего несколько секунд [39]. Выше уже приводилась скорость синтеза полипептидов в клетке, от 600 до 1200 аминокислотных остатков в минуту, для различных бесклеточных систем она составляет от 50 до 300 остатков [40]. В любом случае, времени синтеза и *in vivo*, и *in vitro* достаточно для формирования компактных интермедиатов. Моделью направленного сворачивания можно считать изучение структур, образуемых N-концевыми пептидами растущей длины, вплоть до полноразмерной полипептидной цепи. Такие эксперименты были сделаны с небольшими однодоменными белками, барназой и ингибитором химо-трипсина 2. Поскольку указанные белки обладают быстрой кине-

тикой сворачивания, можно считать, что структуры, образуемые растущими пептидами, действительно успевают появиться в ходе трансляции. Полипептидные фрагменты могут быть получены в высоких концентрациях, а значит, при анализе могут применяться все физические инструментальные подходы. Для ингибитора химотрипсина 2 N-концевые фрагменты менее 40 аминокислотных остатков не имели детектируемой структуры [41, 42]. Фрагмент 1–40 имел локальные ненативные гидрофобные кластеры. Фрагменты 1–53 и 1–60 уже показывали наличие пространственных взаимодействий с общей организацией типа расплавленной глобулы. Кооперативность формирования структуры появлялась при добавлении 60-го аминокислотного остатка (и этот фрагмент по свойствам напоминал переходное состояние), но полностью двухстадийный кооперативный переход в нативное состояние проходил только после добавления остатков 62 и 63, т.е. у полноразмерного белка [41, 42]. Для барназы из семи исследованных фрагментов только самый большой, 1–105, обладал компактной свернутой структурой [43]. Все меньшие фрагменты представляли собой клубки с флуктуирующими элементами вторичной структуры.

Вряд ли рассмотренные белки сворачиваются ко-трансляционно, учитывая, что их С-концевые части необходимы для появления промежуточных структур, а около 20 аминокислотных остатков при синтезе всегда закрыты рибосомой. Тем не менее, указанные примеры показывают направленное сворачивание и появление нативной структуры внутри домена, что, наверное, можно аппроксимировать и для белков большего размера, включая мультидоменные белки.

Принципиальный вопрос состоит в возможных экспериментальных подходах, способных детектировать появление тех или иных элементов конечной нативной структуры белков, по мере синтеза полипептидной цепи на рибосоме в бесклеточных системах экспрессии при концентрациях синтезируемого полипептида порядка от пикомолей до фентомолей и в окружении огромного избытка белков и других компонентов бесклеточной системы, т.е. фактически клеточного цитоплазматического экстракта, содержащего все растворимые компоненты и комплексы, включая такие большие, как сами рибосомы.

Достаточно давно было осознано, что таким инструментом, способным детектировать конформацию белка на рибосоме, могут быть антитела. Было показано, что поликлональная сыворотка к нативной бета-галактозидазе *E. coli* реагирует с рибосомной фракцией из клеток *E. coli*, продуцирующих бета-галактозидазу [44]. Сыворотка реагировала существенно хуже после прогрева рибосомной фракции

при высокой температуре. Результаты были интерпретированы как взаимодействие антител сыворотки с эпитопами, представляющими элементы нативной структуры бета-галактозидазы, на синтезируемом белке, а отсутствие взаимодействия после прогрева рибосомной фракции – как следствие денатурации белка и потери конформационных эпитопов. В то же время очевидно, что использование поликлональной сыворотки не позволяет на самом деле оценить и идентифицировать эпитопы соответствующих антител, содержащихся в ней, и действительно подтвердить конформационную природу эпитопов. После появления моноклональных антител стало возможным использовать их как инструмент для изучения сворачивания белков.

Процессы сворачивания и ассоциации белка оболочки бактериофага Р22 являются достаточно хорошо изученными процессами. Принципиальным моментом является то, что нативная форма белка, тример, формируется очень медленно как при ренатурации, так и в клетках, что, видимо, объясняется его структурой с превалированием β -структур. Трехмерная структура мономера в составе тримера, по данным рентгеноструктурного анализа, состоит из N-концевого головного домена, β -структурного домена (называемого в литературе β helix domain) и C-концевого домена (interdigitated domain) [45]. Был получен набор моноклональных антител против нативного белка оболочки и идентифицированы антитела, способные узнавать индивидуальны для каждого антитела детерминанты, которые появлялись при прохождении определенных этапов сворачивания [46]. Эпитоп, узнаваемый одним антителом, формировался одновременно с появлением свернутого мономера, способного к образованию протримера. Другое антитело узнавало белок после формирования протримера (его характерной особенностью является неустойчивость к повышенной температуре). Наконец, третье антитело узнавало нативный, устойчивый к повышенной температуре тример. Эти же антитела использовали для изучения рибосомо-связанных полипептидов синтезирующегося белка оболочки. Рибосомную фракцию для этого выделяли из клеток, инфицированных дефектным фагом и экспрессирующих повышенное количество исследуемого белка оболочки. Оказалось, что антитело, узнающее свернутый мономер, узнает рибосомо-связанные синтезируемые цепи данного полипептида [47]. В то же время, антитело, узнающее протример, не реагировало с рибосомо-связанными полипептидами. Таким образом, в ходе синтеза белка оболочки бактериофага Р22 проходят стадии сворачивания и появляются элементы структуры, характерные для свернутого

мономера. Далее, используя аналогичный подход, было показано, что антитело, узнающее ранний интермедиат при ренатурации, реагирует также и с рибосомо-связанной полипептидной цепью, подтверждая ко-трансляционное начало формирования нативной структуры [48]. Другое антитело также узнавало рибосомо-связанный полипептид, хотя при ренатурации реагировало только с поздним интермедиатом [48]. Авторы закономерно сделали вывод, что при ко-трансляционном сворачивании полипептидом могут приобретаться структуры, характерные для поздних этапов ренатурации, и связали это с другим путем сворачивания полипептида при его векторном синтезе высокой эффективностью биосинтетического сворачивания данного белка, в противоположность его ренатурации из полностью денатурированного состояния. Было показано, что эпитопы к моноклональным антителам распределены по всей полипептидной цепи и антитела реагируют со всеми тремя структурными доменами белка оболочки, при этом большинство реагируют с серединным β -структурным доменом [49]. Далее авторы исследовали с помощью этих антител процесс ко-трансляционного сворачивания. Для создания прочных комплексов растущих полипептидных цепей с рибосомой использовался новый подход, разработанный этой группой [50]. Авторы показали, что стабильные комплексы можно получить, добавив к С-концу белка последовательность из 17 аминокислот белка SecM из *E. coli*. Таким образом можно получить гомогенные комплексы растущих полипептидов с рибосомой как в бесклеточной системе трансляции, так и *in vivo*. Авторами также учитывалось, что мРНК несет кластеры редких кодонов и образуются паузы в трансляции после появления вышеуказанных фрагментов, что, по идее, делает исследовавшиеся полипептиды естественными интермедиатами в синтезе и сворачивании белка оболочки [51]. Были определены константы связывания антител к полученным рибосомо-связанным полипептидам. Часть антител сразу реагировала с полипептидами с высокими константами, характерными для их связывания с нативным белком, т.е. тримером. Другие антитела показывали слабое связывание на коротких рибосомо-связанных полипептидах с последующим повышением афинности при увеличении размера фрагмента. Такое повышение афинности наблюдалось для антител с эпитопами как в N-концевом домене, так и серединном β -структурном домене. Очень важно, что для самого большого фрагмента 1-666, представляющие полную полипептидную цепь, за исключением крайних С-концевых аминокислот, закрытых рибосомой, все антитела взаимодействовали с константами, близкими к таковым для нативного тримера [52].

Приобретение серединным β -структурным доменом элементов структуры нативного белка в ходе синтеза подтвердило ранее полученные такие же качественные результаты этими авторами [48]. Не менее интересные результаты были получены в рассматриваемой работе [52], когда авторы освободили исследуемые полипептидные фрагменты из рибосомных комплексов и снова определили их взаимодействие с антителами. Во-первых, основная часть фрагментов быстро агрегировала. С оставшимися растворимыми полипептидными цепями антитела продолжали реагировать с константами, сходными с рибосомо-связанными вариантами. Какие элементы структуры характерны для исследуемых укороченных фрагментов, если их сразу экспрессировать как варианты со стоп кодоном на мРНК, а затем ренатурировать из полностью денатурированного состояния? Авторы продолжили такую работу, из-за сильной агрегации им удалось получить только наиболее длинный из укороченных фрагментов, фрагмент 1–556. Оказалось, что антитела к N-концевому домену продолжали прочно взаимодействовать с фрагментом, а антитела к β -структурному домену показывали низкую аффинность или вообще не реагировали. Чтобы подтвердить напрашивающийся вывод, что процесс ренатурации приводит к появлению другой структуры, этот фрагмент и его рибосомо-связанный аналог были подвергнуты протеолизу. У рибосомо-связанного полипептида выявлялся 47 кДа фрагмент, устойчивый к протеолизу, у ренатурированного же он отсутствовал. Разницу в структурах авторы связали, в первую очередь, с β -структурным доменом и сделали вывод, что для эффективного сворачивания, обеспечиваемого в биосинтетическом процессе, β -структурный домен должен достаточно рано, до завершения процесса синтеза, приобрести нативоподобную структуру. Это позволяет избежать агрегации, практически неизбежной при ренатурации белка. Помимо прочего, в ходе биосинтетического сворачивания экспонированные гидрофобные участки β -структурного домена, видимо, могут экранироваться рибосомой, до появления его нативоподобной конформации.

Количественный анализ элементов ко-трансляционного сворачивания был проведен с β -субъединицей триптофан-синтазы *E. coli*. Белок является гомодимером. Использувавшееся конформационно-зависимое моноклональное антитело реагировало с эпитопом в N-концевом домене после формирования расплавленной глобулы (см. ссылки в [53]). Было определено, что антитело начинало взаимодействовать с растущими пептидами еще до завершения синтеза N-концевого домена [53]. Полученный N-концевой фрагмент белка в стабильном комплексе с рибосомами реагировал с антителом с

высокой афинностью, $6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, соответствующей сродству антитела к нативному гомодимеру триптофан-синтазы, составляющему $6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, что очень близко к полученным результатам [53, 54]. Соответственно, большая часть растущего пептида находится в компактной нативо-подобной конформации, способной связывать антитело. Данный N-концевой фрагмент β -субъединицы триптофан-синтазы образует в нативном белке три взаимодействующие между собой α -спирали и две β -структуры, фактически являясь компактным субдоменом. Далее в экспериментах с пульсовым радиоактивным мечением синтезируемого пептида и короткой пульсовой иммуноадсорбции рибосомо-связанных полипептидных цепей было показано, что растущая полипептидная цепь приобретает элементы пространственной структуры действительно по ходу процесса трансляции [47].

Изучение образования дисульфидных связей оказалось очень информативным подходом как для процесса биосинтетического сворачивания белков (естественно, для белков с дисульфидными связями), так и для процесса ренатурации. Элегантные работы были сделаны с выяснением процесса формирования дисульфидных связей у иммуноглобулинов класса G [55]. Легкие цепи иммуноглобулинов этого класса являются двухдоменными полипептидами с двумя внутримолекулярными связями, по одной в N-концевом и C-концевом домене. Растущие полипептиды легких цепей транслируются в люмен эндоплазматического ретикулума, где и сворачиваются, а затем ассоциируют с тяжелыми цепями иммуноглобулинов. В работе использовали культуру клеток, секретирующих антитело. Было показано, что формирование связи между остатками цистеинов Cys35 и Cys100 в N-концевом домене начинается, когда растущие цепи достигают размера 15.5 кДа. Формирование этой связи практически полностью завершается у растущих полипептидов, достигших массы 18 кДа. Расчет показал, что образование этой дисульфидной связи требует около трех секунд. Принципиальное значение этих результатов состоит в том, что они показывают ко-трансляционное биосинтетическое сворачивание в клетках. Для других белков также было показано ко-трансляционное формирование S-S связей. Так происходит для гликопротеина оболочки gp160 вируса HIV1 [56]. При этом формирование S-S связей сопровождается их изомеризацией до образования корректных связей. У гемагглютинина вируса гриппа завязывание дисульфидных связей также начинается ко-трансляционно, при этом, как показывают авторы, этот процесс может эффективно завершаться в модельных экспериментах уже с полноразмерными цепями [57].

VI. СВЯЗЫВАНИЕ КОФАКТОРОВ И ЛИГАНДОВ

Связывание кофакторов и лигандов происходит после формирования белками нативной или промежуточной структуры, в любом случае наличие определенной структуры белка является необходимым для связывания. Связывание кофакторов и лигандов часто стабилизирует белковые структуры и может влиять на их пути сворачивания. Белок D1 из реакционного центра хлоропластов связывает сразу несколько кофакторов. Было показано, что связывание кофакторов происходит во время синтеза и транслокации белка в мембрану тилакоидов [58]. Для синтеза полноразмерного белка и предотвращения его деградации требовалось ко-трансляционное связывание хлорофилла [59]. Гликозилирование гемагглютинина вируса гриппа происходит в люмене эндоплазматического ретикулума. Блокирование гликозилирования растущих цепей белка приводило к нарушению процесса сворачивания и образованию агрегатов [60]. В бесклеточной системе трансляции из ретикулоцитов кролика изучалось связывание гема α глобином [61, 62]. Во-первых, оказалось, что гем оказывается ассоциированным с полирибосомами [62]. Затем было определено связывание гема с различными N-концевыми рибосомо-связанными фрагментами глобина, от 34 до 140 аминокислотных остатка. Оказалось, что гем может связываться с растущими цепями α -глобина при достижении ими длины в 86 аминокислотных остатка [61].

Во всех приведенных случаях связывание лигандов и кофакторов может происходить вскоре появления соответствующих сайтов связывания на растущих полипептидах, что способно стабилизировать пространственную структуру синтезирующихся белков.

Присутствие кофакторов или лигандов также может модулировать ко-трансляционную укладку. Так, например, было обнаружено, что связывание АТФ способствует ко-трансляционной укладке N-концевого нуклеотид-связывающего субдомена регулятора трансмембранной проводимости муковисцидоза человека (CFTR), что, в свою очередь, способствует ко-трансляционной укладке других доменов этого белка [63]. В качестве второго примера было показано, что связывание Zn^{2+} индуцирует сворачивание небольшого домена с цинковыми пальцами из регуляторного белка ADR1 в выходном туннеле рибосомы [18].

VII. ПОЗДНИЕ СТАДИИ ПРОЦЕССА СВОРАЧИВАНИЯ И ФОРМИРОВАНИЕ ОЛИГОМЕРНЫХ СТРУКТУР

Сывороточный альбумин крыс является секретлируемым белком, который содержит 17 дисульфидных связей, распределенных вдоль полипептидной цепи. В растущих полипептидах альбумина около половины всех остатков цистеина вовлечены в образование дисульфидных связей (по отсутствию реакции на специфические модифицирующие агенты без предварительного восстановления остатков цистеина) [64]. Эта работа, как и обсуждавшаяся выше работа Бергмана и Кея, замечательна тем, что сделана на белке, синтезируемом *in vivo*, подтверждая, что феномен ко-трансляционного сворачивания существует в клетках.

Большое значение при изучении ко-трансляционного сворачивания имеет выбор модельного белка. Несомненным плюсом является наличие чувствительного энзиматического теста для нативного белка, достаточно чувствительного для количеств, синтезируемых в бесклеточных системах. Соответственно, неудивительно, что работы по ко-трансляционному сворачиванию были проделаны с люциферазой светлячков и роданезой. Данные белки являются мономерами с чувствительными ферментативными тестами. Для обоих белков было показано, что они способны приобретать энзиматически активную форму, будучи связаны с рибосомой в виде пептидил-тРНК при условии добавления на С-конец дополнительно более двадцати аминокислотных остатков [65, 66]. При этом ферменты без навески на С-конце или с короткой навеской (13 ак остатков) не проявляли ферментативной активности, пока оставались в комплексе с рибосомой, но становились энзиматически активными после освобождения из рибосом.

Был проанализирован фолдинг белка оболочки вируса Semliki forest [67]. При трансляции вирусной РНК вначале синтезируется вирусный полипротеиновый предшественник, содержащий химотрипсиноподобную протеазу, которая и выщепляет белок оболочки. Оказалось, что при экспрессии как в животных, так и бактериальных клетках, выщепление белка оболочки происходит вскоре после завершения синтеза протеазы, задолго до завершения синтеза полипротеина. Таким образом, процесс сворачивания протеазы в функциональный белок происходит ко-трансляционно и очень быстро. Подтверждение этих результатов приведено в работе, где изучалась ренатурация данной химотрипсиноподобной протеазы – белок сворачивался за секунды [68]. Любопытное явление было обнаружено для гена NF каппа В1, который кодирует два белка – 50 кДа и 105 кДа. Первый

из них является N-концевой частью полноразмерного 105 кДа белка и получается при протеолитическом процессинге протеосомой. Оказалось, что протеолиз идет ко-трансляционно, до завершения синтеза полноразмерной полипептидной цепи [69]. Если же полипептидная цепь успевает синтезироваться целиком, то уже не является субстратом для протеосомы. Также ко-трансляционно происходит димеризация 50 кДа домена [70].

Образование гетеродимера между белками CAD (ДНКаза, активируемая каспазой) и ее ингибитором ICAD, происходит между синтезируемым CAD и полноразмерным ICAD [71]. Данные по ренатурации CAD свидетельствуют, что взаимодействие между белками происходит, когда CAD принимает структуру, близкую к нативной.

Белок прикрепления к клетке сигма 1 реовируса является тримером. Тримеризация обусловлена двумя частями полипептидной цепи, которые тримеризуются независимо друг от друга: N-концевой третьей полипептидной цепи, которая образует структуру трех- α -спирального клубка, и C-концевой глобулярной частью. Тримеризация N-концевой части полипептидной цепи идет ко-трансляционно, как было показано в экспериментах *in vitro* [72]. Что любопытно, тримеризация может идти и пост-трансляционно, если экспрессировать N-концевые фрагменты полипептидной цепи с делетированной C-концевой частью. Тримеризация C-концевой глобулярной части полноразмерной цепи идет посттрансляционно и, таким образом, формирование зрелого нативного тримера завершается после окончания синтеза на рибосоме [73].

Для одного из ABC транспортеров, мультидоменного трансмембранного белка, было показано по устойчивости растущих полипептидов к обработке протеазой, что фолдинг индивидуальных доменов происходит ко-трансляционно, вскоре после появления соответствующего домена [74].

В конце этого раздела я бы хотел снова вернуться к уже цитировавшимся работам по детекции ферментативной активности бета-галактозидазы *E. coli* в рибосомной фракции. Имеющаяся сейчас структурно-функциональная информация о белке позволяет осмыслить и рационально интерпретировать эти результаты. Белок, как сейчас хорошо известно, является тетрамером, мономер не обладает даже остаточной ферментативной активностью [75]. Полипептидная цепь из 1023 аминокислотных остатков последовательно образует пять доменов, N-концевой фрагмент не входит в состав структурированных доменов и участвует в образовании интерфейса субъединицы тетрамера. Активный центр формируется двумя мономерами [76]. В активный центр вовлечены N-концевые фрагменты полипептидной

цепи. Для бета-галактозидазы, как и ряда других белков, известно явление комплементации, когда два фрагмента белка, представляющие собой неполные полипептидные цепи с делециями в разных участках вместе при смешивании или ко-экспрессии дают функциональный белок. Для бета-галактозидазы явление носит название альфа-комплементации и состоит в том, что белок без N-концевой части дает функциональный продукт при добавлении N-концевых пептидов [77,78]. Феномен существует и при ко-экспрессии таких полипептидов в клетках (что ранее широко использовалось для простого определения экспрессии интересующих генов). Определение трехмерной структуры белка позволило определить структурную основу явления альфа-комплементации [75]. Вполне вероятно, что синтезирующиеся соседние цепи бета-галактозидазы могут начинать димеризацию за счет N-концевых участков еще во время синтеза на полисоме (напомним, что полипептидная цепь очень длинная и со структурной точки зрения такое выглядит вероятным). Кроме этого, возможна ассоциация уже синтезированных цепей с растущими рибосомо-связанными цепями. И то, и другое способно давать димеры и/или тетрамеры, обладающие ферментативной активностью.

VIII. ФЕРМЕНТЫ, КАТАЛИЗИРУЮЩИЕ СВОРАЧИВАНИЕ

Дисульфид-изомераза белков способна влиять на биосинтетическое сворачивание белков, содержащих дисульфидные связи, что в том числе было показано и для клеток. Важным наблюдением явилось связывание дисульфид-изомеразы (используя сшивающие реагенты) с растущими полипептидами [79, 80]. Более того, было продемонстрировано, что фермент необходим для эффективного формирования дисульфидных связей у синтезируемого белка в сопряженной системе трансляции и транслокации [81].

Еще одним ферментом, вовлеченным в сворачивание белков, является пептидил-пролил-изомераза, способная катализировать цис-транс изомеризацию остатков пролина в полипептидных цепях. Эукариотическая пептидил-пролил-изомераза из эндоплазматического ретикулама образовывала промежуточные комплексы с полипептидами, транслоцирующимися в ходе синтеза внутрь люмена [79].

Триггер-фактор, белок *E. coli*, участвующий в терминации трансляции, также обладает активностью пептидил-пролил-изомеразы и был обнаружен в ассоциации с синтезируемыми полипептидами [82, 83]. Дальнейшие исследования показали функции шаперона, выполняемые триггер-фактором, и будут рассмотрены ниже.

IX. НЕРАВНОМЕРНОСТЬ СКОРОСТИ ТРАНСЛЯЦИИ И КО-ТРАНСЛЯЦИОННОЕ СВРАЧИВАНИЕ

Процесс синтеза полипептидов на рибосоме идет с неравномерной скоростью. Вообще неравномерное распределение полипептидных цепей при синтезе, выявляемое при электрофоретическом анализе продуктов трансляции, хорошо знакомо любому исследователю, занимающемуся бесклеточными системами экспрессии [84]. Неравномерность скорости трансляции определяется в первую очередь наличием редких кодонов и их распределением по мРНК (для обзора литературы см. [85]). В 1987 году была высказана гипотеза, что контролируемая скорость трансляции может влиять на эффективность фолдинга [86]. Было предположено, что паузы в трансляции, когда скорость продвижения рибосом по мРНК резко падает, используются для сворачивания уже синтезированных N-концевых фрагментов, что повышает эффективность биосинтетического фолдинга. При анализе набора белков *E. coli* была выявлена корреляция между использованием оптимальных кодонов мРНК и α -спиральной вторичной структурой соответствующих районов полипептидных цепей, в то время как кластеры редких кодонов более соответствовали β -структурам в полипептидных цепях [87]. Любопытно, что корреляции обнаруживались в основном для генов с высоким уровнем экспрессии. Гены белков, синтезируемых в малых количествах, выраженных корреляций между изоакцепторными кодонами и распределением элементов вторичной структуры не показывали. Это может свидетельствовать о том, что эволюционное давление на оптимизацию распределения кодонов, а, значит, вероятно, и оптимизацию процесса фолдинга, существует для белков с высоким уровнем экспрессии. В других работах, при анализе различных баз данных, были также найдены корреляции распределения элементов вторичных структур и редких и оптимальных кодонов внутри и/или на границах вторичных структур [88–91]. Изоакцепторные кодоны были также проанализированы с точки зрения нахождения кодируемых ими аминокислот в стандартных элементах вторичной структуры. Оказалось, что для некоторых из изоакцепторных кодонов соответствующая аминокислота оказывается преимущественно в определенной вторичной структуре [92]. Например, среди кодонов аргинина три кодировали аргинины преимущественно в α -спиралях, один кодон соответствовал аргинину на C-конце α -спиралей, а у двух кодонов не было таких предпочтений.

При анализе 37 мультидоменных белков *E. coli* была обнаружена статистически значимая корреляция между границами доменов и распределением редких кодонов в соответствующих участках мРНК [93]. Гипотеза о необходимости пауз в трансляции для правильного ко-трансляционного сворачивания белков содержит ясное экспериментальное предсказание: удаление пауз путем замены редких кодонов на наиболее оптимальные изоакцепторные кодоны должно влиять на сворачивание белка и его эффективность (по крайней мере, это ожидаемо). Такие работы были сделаны с несколькими белками при их экспрессии *in vivo* и *in vitro*. В одной из серий работ, сделанной группой, предложившей исходно эту гипотезу (см. выше), в качестве модели использовали ген дрожжей TRP3, кодирующий бифункциональный белок, состоящий из антранилат-синтазы и индол-глицерол-фосфат-синтазы [94]. Ген содержит подряд сразу десять редких кодонов в участке между двумя функциональными доменами. Этот участок был заменен на десять изоакцепторных кодонов, оптимальных для дрожжей, без изменения аминокислотной последовательности белка. Такой измененный ген был введен в дрожжи с инактивированным исходным геном, при этом удельная активность обоих функциональных доменов уменьшилась в полтора раза [94, 95]. Бета-кристаллин также содержит кластер редких кодонов между N-концевым и C-концевым доменами. В другой работе в качестве модели использовался ген хлорамфеникол-ацетил-трансферазы. У него был заменен кластер из 16 редких кодонов на оптимальные для *E. coli* [96]. Надо подчеркнуть, что во всех работах, описываемых здесь, замены кодонов проводились, разумеется, без изменения аминокислотных последовательностей исследуемых белков. При трансляции *in vitro* измененный ген транслировался быстрее, а синтезированная хлорамфеникол-ацетил-трансфераза обладала 80% удельной активности от исходного белка. В другой работе использовался ген *E. granulosus*, кодирующий белок, связывающий жирные кислоты, который содержит кластер из пяти редких кодонов, соответствующий в белке повороту между двумя короткими α -спиралями. Замена этих кодонов на оптимальные привела к уменьшению растворимости белка при его экспрессии в клетках *E. coli* [97]. Более того, к этому же эффекту приводила замена всего одного кодона из кластера.

Обсуждаемая область исследований [98] привела и к появлению практических рекомендаций и выводов касательно максимизации экспрессии гетерологичных генов (для обзора см. [99], также [100, 101]).

Х. ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ БИОСИНТЕТИЧЕСКОГО СВРАЧИВАНИЯ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ

Наблюдения, что биосинтетическое сворачивание белков может быть быстрее и протекать с большей эффективностью, чем их ренатурация, накапливались в течение продолжительного времени для целого ряда белков [55, 60, 64, 76, 102, 103], см. также ссылки в этих работах). На качественном уровне сравнивались результаты, зачастую разными группами и в разных условиях, при биосинтетическом сворачивании и ренатурации того или иного белка. Как правило, в экспериментах по ренатурации используются более высокие концентрации белков, чем это имеет место при биосинтетическом сворачивании. Понятно, что это может сильно влиять, например, на эффективность и выход нативного белка, поскольку агрегация является концентрационно-зависимым процессом и нелинейно растет при увеличении концентрации сворачивающегося белка. Также при сравнительном анализе нельзя забывать, что в экспериментах по ренатурации сразу все молекулы денатурированного белка начинают сворачиваться, будучи помещенными в «нативные» условия. Необходимо отметить, что ренатурация белка и его же ко-трансляционное сворачивание в любом случае являются двумя разными процессами. Процесс ренатурации начинается для всех полипептидных цепей одновременно при создании необходимых условий (в первую очередь – буфер, также это может быть наличие необходимых кофакторов и т.д.). В бесклеточных системах трансляции имеет место более сложная картина, включающая начальный лаг, определяемый временем, необходимым для синтеза белка, появление первых синтезированных молекул белка и затем постоянное наращивание его количества по мере синтеза. В силу этого невозможно прямое сравнение кинетики и других параметров сворачивания для ренатурации некоторого фиксированного количества белка, одновременно начинающего сворачиваться, и его биосинтетического сворачивания, т.к. появление аналогичного количества белка будет растянуто по времени. Учитывая указанные ограничения, можно тем не менее отметить, что люцифераза светлячков и белок обелин из медуз сворачивались быстрее и более эффективно, когда синтезировались в бесклеточных системах, чем при их ренатурации в тех же условиях [104, 105].

Ранняя работа по статистическому анализу более двухсот пространственных белковых структур выявила тенденцию, внутри белковых доменов, что аминокислотные остатки взаимодействуют с N-концевыми порциями полипептидной цепи и N-концевой участок, в среднем, более компактен, чем C-концевая часть [106]. Было прове-

дено компьютерное моделирование появления элементов вторичной/пространственной структуры у синтезируемого полипептида в выходном туннеле рибосомы [107]. Оказалось, что наличие внешнего пространственного ограничителя, коим является туннель, может влиять на кинетику фолдинга, ускоряя его. Авторы объясняют это тем, что предпочтительными по сравнению с развернутыми структурами становятся компактные структуры, более близкие к переходному состоянию, определяющему кинетику фолдинга. Утверждается также, что эффект имеет место для «хорошо сложенных» (well-designed) белков и отсутствует у плохо упакованных (poorly designed) белков, что может объяснять наличие ко-трансляционного сворачивания у одних белков и преимущественно пост-трансляционное сворачивания других белков. Компьютерное моделирование растущей полипептидной цепи показало, что цепь может начинать сворачиваться по мере своего роста и, при условии существования определенного энергетического барьера на пути ее полного разворачивания, сворачивание сильно отличается от сворачивания аналогичной полноразмерной цепи [108]. В работе учитывалась кинетика процессов, т.е. синтеза и сворачивания полипептидной цепи. Более того, окончательные конформации, появляющиеся с максимальными вероятностями, не обязательно относились к конформациям с минимальной энергией. Эта же группа авторов проанализировала пространственные структуры реальных белков с точки зрения следов ко-трансляционного сворачивания в нативную структуру [109]. В частности, авторы провели поиск «предыдущего контакта» для аминокислотных остатков в структурах. Логика анализа в том, что при последовательном сворачивании, каковым является ко-трансляционный процесс, следует ожидать, что аминокислотный остаток имеет больше шансов вступить в контакт с уже свернутыми последовательностями. В ходе анализа авторам удалось найти статистически значимые свидетельства такого «предыдущего контакта» среди α/β белков. Схожий вывод был сделан и при использовании другого подхода к моделированию ко-трансляционного процесса [110]. Оказалось, что, при условии наличия значительных локальных контактов в окончательной пространственной структуре, последовательный, т.е. ко-трансляционный, фолдинг происходит быстрее, чем фолдинг всей цепи. При этом при наличии нескольких альтернативных нативных структур, преимущество получает структура с доминирующими близкими контактами. Наконец, в еще одной модельной работе был получен вывод, что цепи, имеющие стабильную окончательную структуру, имеют не много промежуточных структур при своем росте, и, если имеют, то это нативно-подобные

структуры [111]. Менее стабильные нативные структуры при этом могли образовывать большое количество промежуточных структур при синтезе.

Приведенные теоретические работы, в общем, свидетельствуют в пользу того, что в природе проходила селекция белков, способных ко-трансляционно сворачиваться в нативные структуры. Экспериментально биосинтетический путь сворачивания белка был впервые показан для бактериальной люциферазы, $\alpha\beta$ гетеродимера. Чувствительность ферментативного теста позволяет следить за формированием очень небольших количеств активного гетеродимера в ходе синтеза и в процессе ренатурации. Было показано, что β -субъединица к моменту освобождения из рибосомы уже приобретает некоторую структуру, так что время необходимое для завершения процесса сворачивания существенно короче, чем время, требуемое для ренатурации денатурированной субъединицы в аналогичных условиях. Ко-трансляционное сворачивание полипептида на рибосоме является необходимым условием для быстрого приобретения нативной структуры [112]. Далее было установлено, что продуктом биосинтетического сворачивания является нестабильный интермедиат β , очень быстро ассоциирующий с α -субъединицей [113]. В отсутствие партнера, α -субъединицы, β -субъединица переходит в более термодинамически устойчивую форму, и медленная скорость реакции ассоциации будет определяться распределением β -субъединицы между β_1 и β^* , $\beta_1 \leftrightarrow \beta^*$, где β_1 является более стабильной формой и, следовательно, доминирует, а β^* – менее стабильная минорная форма. Модель позволяла сделать экспериментальные предсказания, которые подтвердили ее основательность [113]. Реальная константа ассоциации больше чем на три порядка превышает кажущуюся константу ассоциации. В общем смысле, модель предполагает, что с α -субъединицей ассоциирует промежуточная форма β -субъединицы с высокой энергией и β^* соответствует этой нестабильной форме. Биосинтетическое сворачивание и ренатурация β -субъединицы сливаются при образовании интермедиата β^* , который способен быстро ассоциировать с α . В контексте биосинтетического сворачивания форма β_1 , образующаяся в отсутствие α , является интермедиатом на альтернативном непродуктивном пути сворачивания.

Развитием вышеприведенных работ стали изящные эксперименты, где было показано, что эффективность сборки гетеродимера люциферазы связана с последовательной трансляцией с полицистронной мРНК, обеспечивая правильную пространственную локализацию возникающих субъединиц [114].

XI. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ШАПЕРОНЫ В КО-ТРАНСЛЯЦИОННОМ СВРАЧИВАНИИ

Недавние работы, основанные на недавно достигнутой возможности получения трехмерной структуры рибосомы и ее комплексов с различными белками, показывают, что, действительно, процессы завершения синтеза, терминации и сворачивания могут быть тесно связаны на рибосоме в прямом смысле слова. Триггер-фактор способен прочно взаимодействовать с рибосомой и играть роль шаперона при начале сворачивания вновь синтезированных полипептидных цепей. Триггер-фактор связывается с белками большой субъединицы L29 и L23, которые находятся рядом с местом выхода туннеля для синтезированного пептида из рибосомы [115]. Мутации в экспонированном остатке глутаминовой кислоты в L23, вовлеченном в связывание с триггер-фактором, приводили к тому, что триггер-фактор переставал связываться с рибосомой и растущими пептидами. Такие мутации приводили к агрегации синтезируемых белков в клетках и являлись условно летальными при отсутствующем DnaK. Трехмерные структуры триггер-фактора в комплексе с 50S субъединицей рибосомы подтвердили, что белок находится у места выхода растущего пептида из рибосомы [116, 117]. Структура позволяет предполагать, что триггер-фактор прикрывает синтезируемый пептид от взаимодействий с компонентами в растворе, предотвращая протеолиз и агрегацию. Кроме этого, у триггер-фактора экспонированы гидрофобные остатки по направлению к месту выхода пептида [116]. Это может позволять гидрофобным остаткам синтезируемого пептида взаимодействовать с ними, также снижая тенденцию к агрегации.

Триггер-фактор существует внутри клетки в виде димера, внутри которого участки связывания субстрата изолированы, чтобы предотвратить беспорядочные взаимодействия с неклиентными белками [118, 119]. Димеры легко диссоциируют, и полученные мономеры быстро и обратимо взаимодействуют с рибосомами для сканирования растущих полипептидных цепей. После связывания в процессе трансляции триггер-фактор может оставаться в контакте с полипептидными цепями в течение 10–100 с (в зависимости от аффинности), даже после его диссоциации от рибосомы [120]. В самом деле, множественные копии фактора могут связываться с одним полипептидом, чтобы задерживать сворачивание до тех пор, пока достаточная длина NC не будет синтезирована и не будет иметь способность продуктивно сворачиваться [121].

Возможное участие триггер-фактора в ко-трансляционном сворачивании, по крайней мере, не является облигаторным. Так, была обнаружена ассоциация триггер-фактора с растущими цепями белка оболочки фага P22 [52]. Тем не менее, ко-трансляционное сворачивание белка проходило с теми же параметрами также и в штамме *E. coli* с делетированным триггер-фактором. Немаловажно, что у рассматриваемого белка оболочки (подробно работы с этим объектом описаны выше) в процессе сворачивания появляются выраженные гидрофобные участки. Возможно, закрытие гидрофобных кластеров растущих полипептидных цепей может осуществляться самой рибосомой.

Несколькими группами исследователей изучалось возможное вовлечение шаперонов HSP70 и HSP60 (GroEL/ES) в процесс ко-трансляционного сворачивания белков.

Анализ полирибосомных комплексов, выделенных из прокариотических и эукариотических клеток, показал наличие в них белков семейства HSP70, которые могли быть ассоциированы с растущими полипептидами [122–124]. Два члена семейства HSP70 в клетках дрожжей, Ssb1p и Ssb2p, взаимодействовали с растущими полипептидами именно на транслирующих рибосомах [124]. Клетки дрожжей с дефектными Ssb1p и Ssb2p имели меньше полирибосом. Этот эффект мог быть супрессирован повышенной экспрессией продукта гена HBS1, кодирующего полипептид, имеющий сходство по первичной структуре с фактором элонгации трансляции EF1 α и фактором терминации трансляции [124].

При синтезе роданезы бесклеточной системе из *E. coli* накапливается достаточно большое количество полноразмерного полипептида, остающегося связанным с рибосомой [125]. Указанный полноразмерный полипептид находится в форме пептидил-тРНК, т.к. освобождается пурамицином из комплекса с рибосомами и стабилизируется на рибосоме спарсомицином (ингибитором пептидилтрансферазы). При этом освобожденный полипептид не приобретает ферментативной активности. Добавление шаперонов семейств HSP70 и HSP60 в присутствии АТФ приводило к освобождению в раствор ферментативно активной роданезы. Необходимо напомнить, что роданеза – белок животного происхождения, а значит, сворачивается в эволюционно далекой от нее системе. Кроме этого, роданеза здесь синтезируется и сворачивается без лидерной последовательности, как это имеет место в животных клетках.

Не менее важным является то, что для ряда белков было показано, что их ко-трансляционное сворачивание не требует HSP70. Это

касается, например, белка оболочки вируса Semliki Forest [67] и белка оболочки бактериофага P22 [52]. В качестве еще одного примера можно привести люциферазу светлячков. Ренатурация белка обязательно требует наличия HSP70. В то же время, синтез белка в системе экспрессии *E. coli*, без HSP70, приводил к появлению активного белка [126]. Данные результаты могут указывать как на различие в путях ко-трансляционного сворачивания белка и его ренатурации, так и на возможную компенсацию участия HSP70 компонентами рибосомы.

Можно заключить, что необходимость участия белков теплового шока семейства HSP70 в ко-трансляционном сворачивании зависит от синтезируемого белка. Это, собственно, отражает и участие HSP70 в ренатурации белков, когда только для небольшой части белков необходимо это семейство шаперонов. Как уже указывалось, наличие ассоциации растущих пептидов с HSP70 само по себе не означает необходимости этого взаимодействия для сворачивания белка.

Исследования по возможному вовлечению в ко-трансляционное сворачивание шаперонов семейства HSP60 дали противоречивые результаты. В первую очередь это связано с трудностью разграничить взаимодействие шаперона с растущим полипептидом и с полипептидом после завершения синтеза, освободившимся в раствор. Освобождение в раствор С-концевого сегмента полипептида, 20–30 аминокислотных остатков, укрытых в рибосоме в ходе синтеза, может существенно влиять как на сворачивание полипептида, так и на его взаимодействие с шаперонами. Поэтому приведенные выше результаты о вовлеченности GroEL в получение энзиматически активной роданезы не могут рассматриваться как доказательство взаимодействия шаперона именно с рибосомо-связанными полипептидами. Подобные результаты, интерпретировавшиеся как взаимодействие GroEL с рибосомо-связанными полипептидами, были получены для шаперона TriC, члена семейства HSP60 у животных, при синтезе светлячковой люциферазы и актина [127, 128]. Хотя приведенные в указанных работах результаты четко указывают на необходимость HSP60 для продуктивного сворачивания упомянутых белков, они не свидетельствуют об участии HSP60 в сворачивании белков на рибосоме. Другим фактором является огромный избыток эндогенных шаперонов над синтезируемыми пептидами в бесклеточных системах трансляции, 2.6 мкМ GroEL [129] и 1 мкМ TriC [127] по сравнению с концентрациями полипептидов порядка 1–10 нМ. Следовательно, даже минимального неспецифического загрязнения рибосомной фракции большими частицами HSP60 (хочется добавить – загрязнения, неизбежного при использовавшихся методах отделения рибо-

сомной фракции) будет достаточно для связывания существенной части синтезированных полипептидов после их освобождения из рибосом. Тщательное исследование полирибосом из *E. coli* [123] и из бесклеточной системы при синтезе роданезы [130] не выявило взаимодействия GroEL с растущими полипептидами. Напротив, только после освобождения полипептидов из рибосом те были обнаружены во временной ассоциации с GroEL. В работе с эукариотическими митохондриальными белками их взаимодействия с членами семейства HSP60 были обнаружены только после завершения их синтеза и транслокации через мембрану [131].

Пожалуй, впервые убедительные доказательства вовлеченности GroEL в ко-трансляционное сворачивание были представлены в работах группы Уэда [132, 133]. Главным преимуществом работ является использование системы трансляции *E. coli*, реконструированной из индивидуальных компонентов [134]. Таким образом, удалось гарантировать полное отсутствие эндогенных шаперонов и избежать проблем с интерпретацией результатов, характерных для систем, так или иначе просто обедненных тем или иным шапероном. Для анализа процесса сворачивания был выбран белок, чья растворимость при синтезе в указанной системе существенно возрастала в присутствии GroEL/ES [133]. Это S-аденозилметионин-синтетаза, белок *E. coli*, представляющий собой гомотетрамер. При синтезе белка в отсутствие факторов терминации трансляции и формирования рибосомных комплексов, несущих рибосомо-связанные транскрибируемые полипептиды, была отмечена ассоциация GroEL с полирибосомами. Мутантный GroEL с существенно замедленным гидролизом АТФ и, значит, замедленным циклом функционирования, связывался с рибосомами в больших количествах, что логически следует ожидать при связывании GroEL с растущими полипептидами. В присутствии GroEL полипептиды оказывались защищенными от протеаз. Был проведен анализ связывания GroEL с рибосомо-связанными полипептидами различной длины S-аденозилметионин синтетазы. Оказалось, что GroEL связывается после синтеза основной части белка [132]. Было также показано, что GroES образует комплекс с GroEL, ассоциированным с синтезируемым полипептидом. Комплекс образуется за счет связывания GroES к транс-кольцу GroEL, что следует из отсутствия образования такого комплекса при использовании однокольцевой формы GroEL.

Потенциальный недостаток данного подхода есть следствие его преимущества. В системе полностью отсутствуют DnaK и триггер-фактор. Полученные результаты показывают, что GroEL может, по

крайней мере, компенсировать их отсутствие для обеспечения ко-трансляционного сворачивания. Однако вопрос, как и в какой мере эти группы шаперонов вовлечены в ко-трансляционное сворачивание, когда присутствуют все вместе, как то и имеет место *in vivo*, остается открытым.

Здесь же необходимо напомнить о подсчетах той фракции синтезируемых полипептидов, в сворачивании которых могут принимать участие шапероны (т.е. на какое количество полипептидов может хватить имеющихся в клетке шаперонов) [129]. Расчет показал, что не более 5% полипептидов *E. coli* могут сворачиваться с помощью GroEL.

XII. КО-ТРАНСЛЯЦИОННОЕ СВОРАЧИВАНИЕ БЕЛКОВ И ЕГО ФИЗИЧЕСКИЙ СМЫСЛ

Данный обзор по необходимости затрагивает физические основы сворачивания полипептидов, так как без этого невозможно ни построение гипотез касательно отдельных принципов биосинтетического сворачивания, ни адекватное объяснение полученных экспериментальных результатов.

Сворачивание каждого природного белка в уникальную биологически значимую структуру является первой и необходимой функцией любого белка, и данная функция разделяется всеми белками. Кажется очевидным далее, что сворачивание находится под эволюционным давлением. Для многих, если не для всех, белков, существуют достаточно жесткие ограничения на время сворачивания и выход конечной структуры. А коль скоро так, то селекция проходила для процесса биосинтетического сворачивания в определенном клеточном окружении.

Крайняя позиция может быть сформулирована следующим образом: процесс биосинтетического сворачивания не имеет никакого отношения к физическим принципам и механизмам сворачивания белков. Время синтеза даже крупных полипептидов в клетке не более нескольких минут, за это время способны сформироваться только интермедиаты на пути сворачивания, такие как расплавленная глобула, которые не являются скоростью-лимитирующими в процессе сворачивания, а скорость-лимитирующие стадии появляются позже. Таким образом, путь сворачивания белка в клетке практически тождествен процессу ренатурации развернутых полипептидов и никакого влияния на кинетику и пути сворачивания ко-трансляционное сворачивание иметь не может. Как было рассмотрено выше, векторная природа

синтеза и сворачивания растущей полипептидной цепи позволяет избегать непродуктивных взаимодействий, неизбежных при ренатурации полноразмерного полипептида. Отсутствие сворачивания в ходе синтеза должно приводить к тому, что сворачивание в этом случае начинается с развернутого полноразмерного полипептида и схоже с процессом ренатурации денатурированных белков. Такой процесс характеризуется высоким барьером активации, а значит, медленной скоростью сворачивания. Образование промежуточных структур в ходе ко-трансляционного сворачивания позволяет избежать кинетических ловушек, лимитирующих скорость ренатурации у больших белков, уменьшает барьер активации и ускоряет процесс сворачивания.

Можно предположить, что некоторые сегменты белков могут определять ко-трансляционный путь сворачивания, играя роль, схожую с ролью про-последовательностей в полипептидах, которые необходимы для сворачивания в нативную структуру, но в ходе процессинга удаляются и не составляют части белка в его окончательной нативной форме [135–138]. Для мультидоменных белков, своевременное появление С-концевых фрагментов индивидуальных доменов может играть такую роль, «запирая» правильную структуру домена.

В течение ряда лет развивается представление о сворачивании как процессе, проходящем в конформационном пространстве, доступном данному полипептиду [139–141]. Сворачивание можно представить как «скольжение» полипептида вниз по поверхности воронки, которая представляет собой энергетический ландшафт данной белковой цепи. Каждый уровень поверхности соответствует определенной конформационной энергии полипептида. Нативной структуре соответствует состояние с глобальным энергетическим минимумом. Такое представление о сворачивании белков фокусируется не на дискретных интермедиатах, а на энергетических поверхностях, определяющих ход сворачивания. Помимо прочего, это дает наглядную визуальную картину процесса сворачивания.

Этот подход был адаптирован для представления процессов ко-трансляционного сворачивания [40, 141]. По мере роста синтезируемого полипептида на рибосоме общее количество его доступных конформаций возрастает (воронка расширяется) и, в отсутствие сворачивания, поверхность воронки стремится вверх к более высоким энергиям. Такая модель является некоторым упрощением, т.к. в действительности растущие полипептиды при синтезе формируют свои собственные энергетические поверхности, которые к моменту завершения переходят в энергетический ландшафт, характерный для

полноразмерного полипептида. Ко-трансляционное сворачивание может быть представлено как тоннельный процесс, в котором растущий полипептид сворачивается по мере синтеза через серию промежуточных интермедиатов, сохраняя более низкую энергию, чем в случае синтеза без сворачивания. Данный интермедиат может быстро доходить до минимума конформационной энергии, т.е. приобретать нативную структуру. Разным белкам могут требоваться N-концевые фрагменты различной длины, прежде чем промежуточные структуры будут стабилизироваться, т.е. тоннели могут начинаться с полипептидов различной длины и при различных уровнях энергии. Данное представление ко-трансляционного сворачивания также явно демонстрирует, что при этом удается избегать высокого барьера активации процесса и кинетических ловушек при сворачивании денатурированного белка (представляют собой локальные провалы энергии на пути сворачивания, из которых трудно выбраться).

Шапероны и белки-катализаторы сворачивания могут взаимодействовать как с растущими полипептидами, так и с полноразмерным полипептидом после освобождения из рибосомы. Механизмы действия молекулярных шаперонов являются отдельной очень большой темой, которой посвящено огромное количество исследований (см. в [141, 142]). Шапероны могут оказывать множество различных эффектов на сворачивание белков. Простая циклическая модель предполагает, что при сворачивании простое связывание интермедиатов, склонных к ассоциации, способно уменьшать агрегацию. Другие модели предполагают разворачивание неправильно свернутых форм белка шапероном для нового цикла сворачивания. Наконец, еще одна экспериментально показанная возможность, что шаперон может освобождать полипептид в форме, которая способна достигнуть нативной структуры быстрее, чем форма, первоначально связанная шапероном [143]. Такая форма неизбежно должна обладать большей энергией, чем изначально связанная форма, т.е. являться интермедиатом с высокой энергией, и приближаться к переходному состоянию полипептида. Нельзя не отметить внутреннюю близость этой модели и предлагаемой физической модели ко-трансляционного сворачивания. Это может являться отражением использования в эволюции единых принципов в сворачивании белков и направленности всего биосинтетического сворачивания полипептидов в сторону обеспечения максимальной скорости и эффективности этого процесса.

Графическое представление такого понимания физической природы ко-трансляционного сворачивания дано на Рисунке.

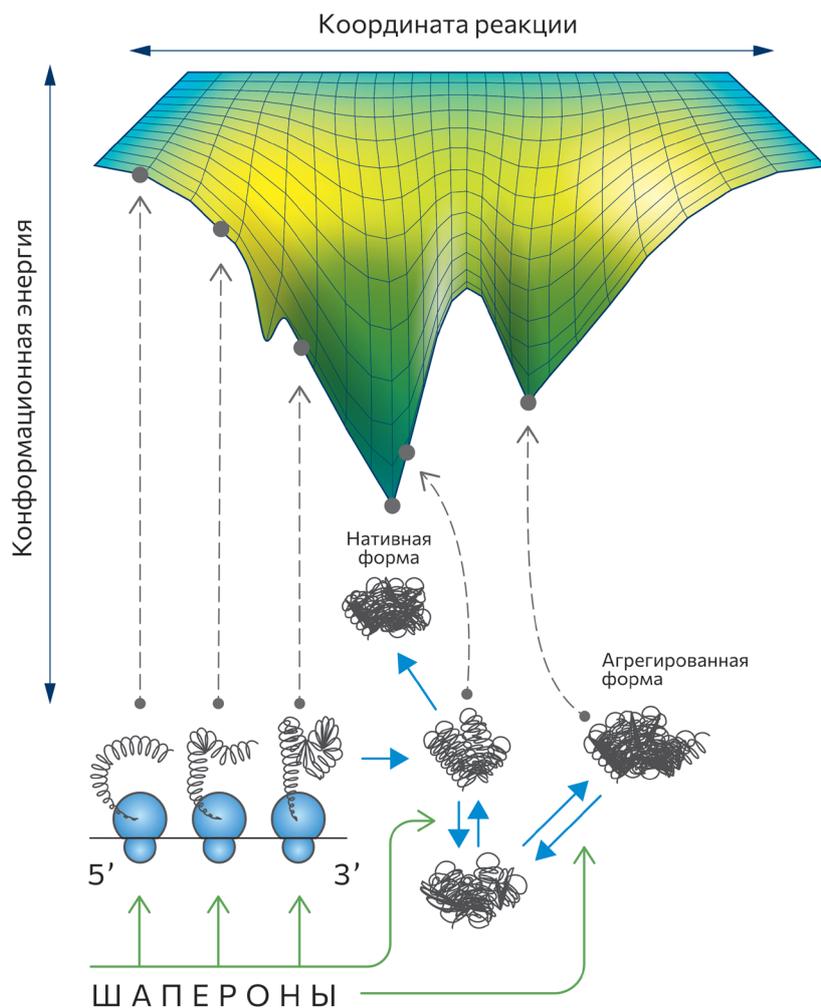


Рис. Схема котрансляционного сворачивания белков с использованием концепции энергетических ландшафтов сворачивания.

Воронка представляет собой процесс котрансляционного сворачивания через промежуточные интермедиаты растущих пептидов, которые при этом могут избежать кинетических ловушек. Полноразмерный полипептид может появляться в форме с существенно меньшей конформационной энергией и быстрее и с большей эффективностью достигать нативного состояния вследствие меньшего барьера активации. Также полипептид может далее переходить в альтернативную форму и/или агрегировать. Шапероны и ферменты, участвующие в сворачивании (пролил изомераза, дисульфид изомераза), могут влиять на выход нативного белка, максимизируя его, на разных стадиях процесса. Модель является упрощением, т.к. растущие пептиды при каждом шаге синтеза формируют свои собственные энергетические ландшафты.

ХIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как видно, к настоящему времени накоплено огромное количество данных, достаточно полно описывающих различные свойства процесса биосинтетического сворачивания белков. Высказаны основные гипотезы и соображения по соотношению этого процесса с основными физическими параметрами, определяющими процесс самоорганизации полипептидных цепей. На взгляд автора обзора, до сих пор нет детального понимания как именно белки адаптировались и селектировались их последовательности для эффективного сворачивания в условиях и ограничениях, накладываемых процессом биосинтеза и наличием молекулярных шаперонов, других обязательных компонентов клеточного содержимого. Наличие мощных высокопроизводительных молекулярно-биологических методов и инструментальных методов анализа позволяет рассчитывать на прогресс в этом направлении. Правильное понимание любого процесса предполагает возможность его предсказаний и направленных изменений. Огромное число рекомбинантных белков, их различных модифицированных вариантов, *de novo* полипептидов, производится в различных системах экспрессии, часто эволюционно далеких от источника происхождения определенного белка. Это нужно и в исследованиях, и в фармацевтике, и в промышленности. Самой частой проблемой оказывается агрегация белков, как правило, именно эффективное получение того или иного белка в функциональной активной форме становится «бутылочным горлышком». Очевидные решения, такие как дополнительная экспрессия тех или иных шаперонов, далеко не всегда приводят к успеху. На наш взгляд, понимание процесса биосинтетического сворачивания как единого целого процесса должно позволить решать эти проблемы специфично для каждого определенного белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Perrin, D. (1963). Complementation between Products of the β -Galactosidase Structural Gene of *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, **28**, 529–532. <https://doi.org/10.1101/SQB.1963.028.01.070>.
2. Fogel, Z., & Elson, D. (1964). The ribosomal beta-galactosidase of *Escherichia coli*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **80**, 601–613. [https://doi.org/10.1016/0926-6550\(64\)90305-6](https://doi.org/10.1016/0926-6550(64)90305-6).
3. Kiho, Y., & Rich, A. (1964). Induced enzyme formed on bacterial polyribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **51**(1), 111–118.
4. Lederberg, E.M., Cavalli-Sforza, L., & Lederberg, J. (1964). Interaction of streptomycin and a suppressor for galactose fermentation in *e. coli* K-12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **51**, 678–682. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.4.678>.
5. Baldwin, R.L. (1975). Intermediates in protein folding reactions and the mechanism of protein folding. *Annual Review of Biochemistry*, **44**(1), 453–475. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.44.070175.002321>.
6. Lim, V.I., & Spirin, A.S. (1986). Stereochemical analysis of ribosomal transpeptidation conformation of nascent peptide. *Journal of Molecular Biology*, **188**(4), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(86\)80006-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(86)80006-7).
7. Jenner, L., Melnikov, S., de Loubresse, N.G., Ben-Shem, A., Iskakova, M., Urzhumtsev, A., Meskauskas, A., Dinman, J., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2012). Crystal structure of the 80S yeast ribosome. *Current Opinion in Structural Biology*, **22**(6), 759–767. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.07.013>.
8. Lu, J., & Deutsch, C. (2005). Folding zones inside the ribosomal exit tunnel. *Nature Structural & Molecular Biology*, **12**(12), 1123–1129. <https://doi.org/10.1038/nsmb1021>.
9. Ziv, G., Haran, G., & Thirumalai, D. (2005). Ribosome exit tunnel can entropically stabilize α -helices. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**(52), 18956–18961. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508234102>.
10. Holtkamp, W., Kokic, G., Jäger, M., Mittelstaet, J., Komar, A.A., & Rodnina, M.V. (2015). Cotranslational protein folding on the ribosome monitored in real time. *Science (New York, N.Y.)*, **350**(6264), 1104–1107. <https://doi.org/10.1126/science.aad0344>.
11. Wruck, F., Katranidis, A., Nierhaus, K.H., Büldt, G., & Hegner, M. (2017). Translation and folding of single proteins in real time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**(22), E4399–E4407. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617873114>.
12. Haase, N., Holtkamp, W., Lipowsky, R., Rodnina, M., & Rudorf, S. (2018). Decomposition of time-dependent fluorescence signals reveals codon-specific kinetics of protein synthesis. *Nucleic Acids Research*, **46**, 12186–12187. <https://doi.org/10.1093/nar/gky740>.
13. Cassaignau, A.M.E., Launay, H.M.M., Karyadi, M.-E., Wang, X., Waudby, C.A., Deckert, A., Robertson, A.L., Christodoulou, J., & Cabrita, L.D. (2016). A strategy for co-translational folding studies of ribosome-bound nascent chain complexes using NMR spectroscopy. *Nature Protocols*, **11**(8), 1492–1507. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.101>.
14. Waudby, C.A., Wlodarski, T., Karyadi, M.-E., Cassaignau, A.M.E., Chan, S.H.S., Wentink, A.S., Schmidt-Engler, J.M., Camilloni, C., Vendruscolo, M., Cabrita, L.D., & Chris-

- todoulou, J. (2018). Systematic mapping of free energy landscapes of a growing filamin domain during biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **115**(39), 9744–9749. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716252115>.
15. Cabrita, L. D., Cassaignau, A.M.E., Launay, H.M.M., Waudby, C.A., Wlodarski, T., Camilloni, C., Karyadi, M.-E., Robertson, A.L., Wang, X., Wentink, A.S., Goodsell, L., Woolhead, C.A., Vendruscolo, M., Dobson, C.M., & Christodoulou, J. (2016). A structural ensemble of a ribosome-nascent chain complex during cotranslational protein folding. *Nature Structural & Molecular Biology*, **23**(4), 278–285. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3182>.
16. Hoffmann, A., Becker, A.H., Zachmann-Brand, B., Deuerling, E., Bukau, B., & Kramer, G. (2012). Concerted action of the ribosome and the associated chaperone trigger factor confines nascent polypeptide folding. *Molecular Cell*, **48**(1), 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.018>.
17. Nilsson, O.B., Nickson, A.A., Hollins, J.J., Wickles, S., Steward, A., Beckmann, R., von Heijne, G., & Clarke, J. (2017). Cotranslational folding of spectrin domains via partially structured states. *Nature Structural & Molecular Biology*, **24**(3), 221–225. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3355>.
18. Nilsson, O.B., Hedman, R., Marino, J., Wickles, S., Bischoff, L., Johansson, M., Müller-Lucks, A., Trovato, F., Puglisi, J. D., O'Brien, E.P., Beckmann, R., & von Heijne, G. (2015). Cotranslational Protein Folding inside the Ribosome Exit Tunnel. *Cell Reports*, **12**(10), 1533–1540. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.065>.
19. Samelson, A.J., Bolin, E., Costello, S.M., Sharma, A.K., O'Brien, E.P., & Marqusee, S. (2018). Kinetic and structural comparison of a protein's cotranslational folding and refolding pathways. *Science Advances*, **4**(5), eaas9098. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aas9098>.
20. Samelson, A.J., Jensen, M.K., Soto, R.A., Cate, J.H.D., & Marqusee, S. (2016). Quantitative determination of ribosome nascent chain stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**(47), 13402–13407. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610272113>.
21. Zhang, G., Hubalewska, M., & Ignatova, Z. (2009). Transient ribosomal attenuation coordinates protein synthesis and co-translational folding. *Nature Structural & Molecular Biology*, **16**(3), 274–280. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1554>.
22. Deeng, J., Chan, K. Y., van der Sluis, E. O., Berninghausen, O., Han, W., Gumbart, J., Schulten, K., Beatrix, B., & Beckmann, R. (2016). Dynamic Behavior of Trigger Factor on the Ribosome. *Journal of Molecular Biology*, **428**(18), 3588–3602. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.06.007>.
23. Goldman, D.H., Kaiser, C.M., Milin, A., Righini, M., Tinoco, I., & Bustamante, C. (2015). Mechanical force releases nascent chain-mediated ribosome arrest in vitro and in vivo. *Science*, **348**(6233), 457–460. <https://doi.org/10.1126/science.1261909>.
24. Kaiser, C.M., Goldman, D.H., Chodera, J.D., Tinoco, I., & Bustamante, C. (2011). The ribosome modulates nascent protein folding. *Science (New York, N.Y.)*, **334**(6063), 1723–1727. <https://doi.org/10.1126/science.1209740>.
25. Liu, K., Maciuba, K., & Kaiser, C.M. (2019). The Ribosome Cooperates with a Chaperone to Guide Multi-domain Protein Folding. *Molecular Cell*, **74**(2), 310–319.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.043>.
26. Tian, P., Steward, A., Kudva, R., Su, T., Shilling, P.J., Nickson,

- A.A., Hollins, J.J., Beckmann, R., von Heijne, G., Clarke, J., & Best, R.B. (2018). Folding pathway of an Ig domain is conserved on and off the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **115**(48), E11284–E11293. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810523115>.
27. Bhushan, S., Gartmann, M., Halic, M., Armache, J.-P., Jarasch, A., Mielke, T., Berninghausen, O., Wilson, D.N., & Beckmann, R. (2010). alpha-Helical nascent polypeptide chains visualized within distinct regions of the ribosomal exit tunnel. *Nature Structural & Molecular Biology*, **17**(3), 313–317. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1756>.
28. Farias-Rico, J.A., Selin, F.R., Myronidi, I., Frühauf, M., & Heijne, G. von. (2018). Effects of protein size, thermodynamic stability, and net charge on cotranslational folding on the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **115**(40), E9280–E9287. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812756115>.
29. Kudva, R., Tian, P., Pardo-Avila, F., Carroni, M., Best, R.B., Bernstein, H.D., & von Heijne, G. (2018). The shape of the bacterial ribosome exit tunnel affects cotranslational protein folding. *ELife*, **7**, e36326. <https://doi.org/10.7554/eLife.36326>.
30. Zhou, H.X., & Dill, K.A. (2001). Stabilization of proteins in confined spaces. *Biochemistry*, **40**(38), 11289–11293. <https://doi.org/10.1021/bi0155504>.
31. Deckert, A., Waudby, C.A., Wlodarski, T., Wentink, A.S., Wang, X., Kirkpatrick, J.P., Paton, J.F.S., Camilloni, C., Kucic, P., Dobson, C.M., Vendruscolo, M., Cabrita, L.D., & Christodoulou, J. (2016). Structural characterization of the interaction of α -synuclein nascent chains with the ribosomal surface and trigger factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**(18), 5012–5017. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519124113>.
32. Voss, N.R., Gerstein, M., Steitz, T.A., & Moore, P.B. (2006). The geometry of the ribosomal polypeptide exit tunnel. *Journal of Molecular Biology*, **360**(4), 893–906. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.05.023>.
33. Kudlicki, W., Coffman, A., Kramer, G., & Hardesty, B. (1997). Ribosomes and ribosomal RNA as chaperones for folding of proteins. *Folding & Design*, **2**(2), 101–108. [https://doi.org/10.1016/S1359-0278\(97\)00014-X](https://doi.org/10.1016/S1359-0278(97)00014-X).
34. Kramer, G., Ramachandiran, V., & Hardesty, B. (2001). Cotranslational folding — omnia mea mecum porto? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **33**(6), 541–553. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(01\)00044-9](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(01)00044-9).
35. Kramer, G., Kudlicki, W., McCarthy, D., Tsalkova, T., Simmons, D., & Hardesty, B. (1999). N-terminal and C-terminal modifications affect folding, release from the ribosomes and stability of in vitro synthesized proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **31**(1), 231–241. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(98\)00143-5](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(98)00143-5).
36. Kudlicki, W., Odom, O.W., Merrill, G., Kramer, G., & Hardesty, B. (1995). Inhibition of the release factor-dependent termination reaction on ribosomes by DnaJ and the N-terminal peptide of rhodanese. *Journal of Bacteriology*, **177**(19), 5517–5522. <https://doi.org/10.1128/jb.177.19.5517-5522.1995>.
37. Kudlicki, W., Coffman, A., Kramer, G., & Hardesty, B. (1997). Renaturation of rhodanese by translational elongation factor (EF) Tu. Protein refolding by EF-Tu flexing. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**(51), 32206–32210. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.51.32206>.

38. Roder, H., & Colón, W. (1997). Kinetic role of early intermediates in protein folding. *Current Opinion in Structural Biology*, **7**(1), 15–28. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(97\)80004-8](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(97)80004-8).
39. Ptitsyn, O.B. (1995). Molten globule and protein folding. *Advances in Protein Chemistry*, **47**, 83–229. [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60546-x](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60546-x).
40. Fedorov, A.N., & Baldwin, T.O. (1997). Cotranslational protein folding. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**(52), 32715–32718.
41. de Prat Gay, G., Ruiz-Sanz, J., Neira, J.L., Corrales, F.J., Otzen, D.E., Ladurner, A.G., & Fersht, A.R. (1995). Conformational pathway of the polypeptide chain of chymotrypsin inhibitor-2 growing from its N terminus in vitro. Parallels with the protein folding pathway. *Journal of Molecular Biology*, **254**(5), 968–979. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0669>.
42. De Prat Gay, G., Ruiz-Sanz, J., Neira, J.L., Itzhaki, L.S., & Fersht, A.R. (1995). Folding of a nascent polypeptide chain in vitro: cooperative formation of structure in a protein module. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**(9), 3683–3686. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.9.3683>.
43. Neira, J.L., & Fersht, A.R. (1999). Exploring the folding funnel of a polypeptide chain by biophysical studies on protein fragments. *Journal of Molecular Biology*, **285**(3), 1309–1333. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2249>.
44. Hamlin, J., & Zabin, I. (1972). Galactosidase: immunological activity of ribosome-bound, growing polypeptide chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **69**(2), 412–416. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.2.412>.
45. Steinbacher, S., Miller, S., Baxa, U., Budisa, N., Weintraub, A., Seckler, R., & Huber, R. (1997). Phage P22 tailspike protein: crystal structure of the head-binding domain at 2.3 Å, fully refined structure of the endorhamnosidase at 1.56 Å resolution, and the molecular basis of O-antigen recognition and cleavage. *Journal of Molecular Biology*, **267**(4), 865–880. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.0922>.
46. Friguet, B., Djavadi-Ohanian, L., King, J., & Goldberg, M.E. (1994). In vitro and ribosome-bound folding intermediates of P22 tailspike protein detected with monoclonal antibodies. *The Journal of Biological Chemistry*, **269**(22), 15945–15949.
47. Tokatlidis, K., Friguet, B., Deville-Bonne, D., Baleux, F., Fedorov, A.N., Navon, A., Djavadi-Ohanian, L., & Goldberg, M.E. (1995). Nascent chains: folding and chaperone interaction during elongation on ribosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **348**(1323), 89–95. <https://doi.org/10.1098/rstb.1995.0049>.
48. Clark, P.L., & King, J. (2001). A newly synthesized, ribosome-bound polypeptide chain adopts conformations dissimilar from early in vitro refolding intermediates. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**(27), 25411–25420. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008490200>.
49. Jain, M., Evans, M.S., King, J., & Clark, P.L. (2005). Monoclonal antibody epitope mapping describes tailspike beta-helix folding and aggregation intermediates. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**(24), 23032–23040. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501963200>.
50. Evans, M.S., Clarke, T.F., & Clark, P.L. (2005). Conformations of co-translational folding intermediates. *Protein and Peptide Letters*, **12**(2), 189–195. <https://doi.org/10.2174/0929866053005908>.

51. Clarke, T.F., & Clark, P.L. (2008). Rare Codons Cluster. *PLoS ONE*, **3**(10), e3412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003412>.
52. Evans, M.S., Sander, I.M., & Clark, P.L. (2008). Cotranslational folding promotes beta-helix formation and avoids aggregation in vivo. *Journal of Molecular Biology*, **383**(3), 683–692. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.035>.
53. Fedorov, A.N., Friguet, B., Djavadi-Ohanian, L., Alakhov, Y.B., & Goldberg, M.E. (1992). Folding on the ribosome of Escherichia coli tryptophan synthase beta subunit nascent chains probed with a conformation-dependent monoclonal antibody. *Journal of Molecular Biology*, **228**(2), 351–358. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90825-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90825-5).
54. Friguet, B., Fedorov, A., Serganov, A.A., Navon, A., & Goldberg, M.E. (1993). A radioimmunoassay-based method for measuring the true affinity of a monoclonal antibody with trace amounts of radioactive antigen: illustration with the products of a cell-free protein synthesis system. *Analytical Biochemistry*, **210**(2), 344–350. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1206>.
55. Bergman, L.W., & Kuehl, W.M. (1979). Formation of intermolecular disulfide bonds on nascent immunoglobulin polypeptides. *The Journal of Biological Chemistry*, **254**(13), 5690–5694.
56. Land, A., Zonneveld, D., & Braakman, I. (2003). Folding of HIV-1 envelope glycoprotein involves extensive isomerization of disulfide bonds and conformation-dependent leader peptide cleavage. *FASEB Journal*, **17**(9), 1058–1067. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0811com>.
57. Maggioni, M.C., Liscaljet, I.M., & Braakman, I. (2005). A critical step in the folding of influenza virus HA determined with a novel folding assay. *Nature Structural & Molecular Biology*, **12**(3), 258–263. <https://doi.org/10.1038/nsmb897>.
58. Kim, J., Klein, P.G., & Mullet, J.E. (1991). Ribosomes pause at specific sites during synthesis of membrane-bound chloroplast reaction center protein D1. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**(23), 14931–14938.
59. Mullet, J.E., Klein, P.G., & Klein, R.R. (1990). Chlorophyll regulates accumulation of the plastid-encoded chlorophyll apoproteins CP43 and D1 by increasing apoprotein stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**(11), 4038–4042. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.11.4038>.
60. Chen, W., Helenius, J., Braakman, I., & Helenius, A. (1995). Cotranslational folding and calnexin binding during glycoprotein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**(14), 6229–6233. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.14.6229>.
61. Komar, A.A., Kommer, A., Krashe-ninnikov, I.A., & Spirin, A.S. (1997). Cotranslational folding of globin. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**(16), 10646–10651. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.16.10646>.
62. Komar, A.A., Kommer, A., Krashe-ninnikov, I.A., & Spirin, A.S. (1993). Cotranslational heme binding to nascent globin chains. *FEBS Letters*, **326**(1–3), 261–263. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81803-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81803-8).
63. Khushoo, A., Yang, Z., Johnson, A.E., & Skach, W.R. (2011). Ligand-driven vectorial folding of ribosome-bound human CFTR NBD1. *Molecular Cell*, **41**(6), 682–692. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.027>.
64. Peters, T., & Davidson, L.K. (1982). The biosynthesis of rat serum albumin. In vivo studies on the formation of the disulfide bonds. *The Journal of Biological Chemistry*, **257**(15), 8847–8853.

65. Kudlicki, W., Chirgwin, J., Kramer, G., & Hardesty, B. (1995). Folding of an enzyme into an active conformation while bound as peptidyl-tRNA to the ribosome. *Biochemistry*, **34**(44), 14284–14287. <https://doi.org/10.1021/bi00044a003>.
66. Makeyev, E.V., Kolb, V.A., & Spirin, A.S. (1996). Enzymatic activity of the ribosome-bound nascent polypeptide. *FEBS Letters*, **378**(2), 166–170. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01438-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01438-1).
67. Nicola, A.V., Chen, W., & Helenius, A. (1999). Co-translational folding of an alphavirus capsid protein in the cytosol of living cells. *Nature Cell Biology*, **1**(6), 341–345. <https://doi.org/10.1038/14032>.
68. Sánchez, I.E., Morillas, M., Zobeley, E., Kiefhaber, T., & Glockshuber, R. (2004). Fast folding of the two-domain semliki forest virus capsid protein explains co-translational proteolytic activity. *Journal of Molecular Biology*, **338**(1), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.02.037>.
69. Lin, L., DeMartino, G.N., & Greene, W.C. (1998). Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome. *Cell*, **92**(6), 819–828. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81409-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81409-9).
70. Lin, L., DeMartino, G.N., & Greene, W.C. (2000). Cotranslational dimerization of the Rel homology domain of NF-kappaB1 generates p50-p105 heterodimers and is required for effective p50 production. *The EMBO Journal*, **19**(17), 4712–4722. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.17.4712>.
71. Sakahira, H., & Nagata, S. (2002). Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**(5), 3364–3370. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110071200>.
72. Gilmore, R., Coffey, M.C., Leone, G., McLure, K., & Lee, P.W. (1996). Co-translational trimerization of the reovirus cell attachment protein. *The EMBO Journal*, **15**(11), 2651–2658.
73. Leone, G., Coffey, M.C., Gilmore, R., Duncan, R., Maybaum, L., & Lee, P.W. (1996). C-terminal trimerization, but not N-terminal trimerization, of the reovirus cell attachment protein is a posttranslational and Hsp70/ATP-dependent process. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**(14), 8466–8471. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.14.8466>.
74. Kleizen, B., van Vlijmen, T., de Jonge, H.R., & Braakman, I. (2005). Folding of CFTR is predominantly cotranslational. *Molecular Cell*, **20**(2), 277–287. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.09.007>.
75. Matthews, B.W. (2005). The structure of *E. coli* beta-galactosidase. *Comptes Rendus Biologies*, **328**(6), 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2005.03.006>.
76. Jacobson, R.H., Zhang, X.J., DuBose, R.F., & Matthews, B.W. (1994). Three-dimensional structure of beta-galactosidase from *E. coli*. *Nature*, **369**(6483), 761–766. <https://doi.org/10.1038/369761a0>.
77. Langley, K.E., Villarejo, M.R., Fowler, A.V., Zamenhof, P.J., & Zabin, I. (1975). Molecular basis of beta-galactosidase alpha-complementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **72**(4), 1254–1257. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.4.1254>.
78. Zeilstra-Ryalls, J.H., & Somerville, R.L. (1992). Protein-protein interaction in the alpha-complementation system of beta-galactosidase. *Current Topics in Cellular Regulation*, **33**, 81–104. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-152833-1.50011-3>.
79. Klappa, P., Freedman, R.B., & Zimmermann, R. (1995). Protein disul-

- phide isomerase and a luminal cyclophilin-type peptidyl prolyl cis-trans isomerase are in transient contact with secretory proteins during late stages of translocation. *European Journal of Biochemistry*, **232**(3), 755–764.
80. Roth, R.A., & Pierce, S.B. (1987). In vivo cross-linking of protein disulfide isomerase to immunoglobulins. *Biochemistry*, **26**(14), 4179–4182. <https://doi.org/10.1021/bi00388a001>.
81. Bulleid, N.J., & Freedman, R.B. (1988). Defective co-translational formation of disulphide bonds in protein disulphide-isomerase-deficient microsomes. *Nature*, **335**(6191), 649–651. <https://doi.org/10.1038/335649a0>.
82. Hesterkamp, T., Hauser, S., Lütcke, H., & Bukau, B. (1996). Escherichia coli trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**(9), 4437–4441.
83. Valent, Q.A., Kendall, D.A., High, S., Kusters, R., Oudega, B., & Lührink, J. (1995). Early events in preprotein recognition in E. coli: interaction of SRP and trigger factor with nascent polypeptides. *The EMBO Journal*, **14**(22), 5494–5505.
84. Komar, A.A., & Jaenicke, R. (1995). Kinetics of translation of gamma B crystallin and its circularly permuted variant in an in vitro cell-free system: possible relations to codon distribution and protein folding. *FEBS Letters*, **376**(3), 195–198. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01275-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01275-0).
85. Komar, A.A. (2009). A pause for thought along the co-translational folding pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, **34**(1), 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.10.002>.
86. Purvis, I.J., Bettany, A.J.E., Santiago, T.C., Coggins, J.R., Duncan, K., Eason, R., & Brown, A.J.P. (1987). The efficiency of folding of some proteins is increased by controlled rates of translation in vivo: A hypothesis. *Journal of Molecular Biology*, **193**(2), 413–417. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90230-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90230-0).
87. Thanaraj, T.A., & Argos, P. (1996). Protein secondary structural types are differentially coded on messenger RNA. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, **5**(10), 1973–1983. <https://doi.org/10.1002/pro.5560051003>.
88. Adzhubei, A.A., Adzhubei, I.A., Krashennnikov, I.A., & Neidle, S. (1996). Non-random usage of 'degenerate' codons is related to protein three-dimensional structure. *FEBS Letters*, **399**(1–2), 78–82. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(96\)01287-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(96)01287-2).
89. Mukhopadhyay, P., Basak, S., & Ghosh, T.C. (2007). Synonymous codon usage in different protein secondary structural classes of human genes: implication for increased non-randomness of GC3 rich genes towards protein stability. *Journal of Biosciences*, **32**(5), 947–963. <https://doi.org/10.1007/s12038-007-0095-z>.
90. Oresic, M., & Shalloway, D. (1998). Specific correlations between relative synonymous codon usage and protein secondary structure. *Journal of Molecular Biology*, **281**(1), 31–48. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1921>.
91. Xie, T., Ding, D., Tao, X., & Dafu, D. (1998). The relationship between synonymous codon usage and protein structure. *FEBS Letters*, **434**(1–2), 93–96. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00955-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00955-7).
92. Gu, W., Zhou, T., Ma, J., Sun, X., & Lu, Z. (2003). Folding type specific secondary structure propensities of synonymous codons. *IEEE Transactions on NanoBioscience*, **2**(3), 150–157. <https://doi.org/10.1109/TNB.2003.817024>.

93. Thanaraj, T.A., & Argos, P. (1996). Ribosome-mediated translational pause and protein domain organization. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, **5**(8), 1594–1612. <https://doi.org/10.1002/pro.5560050814>.
94. Crombie, T., Swaffield, J.C., & Brown, A.J. (1992). Protein folding within the cell is influenced by controlled rates of polypeptide elongation. *Journal of Molecular Biology*, **228**(1), 7–12. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90486-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90486-4).
95. Crombie, T., Boyle, J.P., Coggins, J.R., & Brown, A.J. (1994). The folding of the bifunctional TRP3 protein in yeast is influenced by a translational pause which lies in a region of structural divergence with *Escherichia coli* indoleglycerol-phosphate synthase. *European Journal of Biochemistry*, **226**(2), 657–664. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb20093.x>.
96. Komar, A.A., Lesnik, T., & Reiss, C. (1999). Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during in vitro translation. *FEBS Letters*, **462**(3), 387–391. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01566-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01566-5).
97. Cortazzo, P., Cerveñansky, C., Marín, M., Reiss, C., Ehrlich, R., & Deana, A. (2002). Silent mutations affect in vivo protein folding in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **293**(1), 537–541. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00226-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00226-7).
98. Sharma, A.K., & O'Brien, E.P. (2018). Non-equilibrium coupling of protein structure and function to translation-elongation kinetics. *Current Opinion in Structural Biology*, **49**, 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.01.005>.
99. Marín, M. (2008). Folding at the rhythm of the rare codon beat. *Biotechnology Journal*, **3**(8), 1047–1057. <https://doi.org/10.1002/biot.200800089>.
100. Angov, E., Hillier, C.J., Kincaid, R.L., & Lyon, J.A. (2008). Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host. *PLoS One*, **3**(5), e2189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002189>.
101. Hatfield, G.W., & Roth, D.A. (2007). Optimizing scaleup yield for protein production: Computationally Optimized DNA Assembly (CODA) and Translation Engineering. *Biotechnology Annual Review*, **13**, 27–42. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(07\)13002-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(07)13002-7).
102. Bergman, L.W., & Kuehl, W.M. (1979). Formation of an intrachain disulfide bond on nascent immunoglobulin light chains. *The Journal of Biological Chemistry*, **254**(18), 8869–8876.
103. Bruckner, P., Eikenberry, E.F., & Prockop, D.J. (1981). Formation of the triple helix of type I procollagen in cellulose. A kinetic model based on cis-trans isomerization of peptide bonds. *European Journal of Biochemistry*, **118**(3), 607–613. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb05562.x>.
104. Berestovskaya, N.G., Shaloiko, L.A., Gorokhovatsky, A.Y., Bondar, V.S., Vysotski, E.S., Maximov, J.E., von Doehren, H., & Alakhov, Y.B. (1999). Cotranslational formation of active photoprotein obelin in a cell-free translation system: direct ultrahigh sensitive measure of the translation course. *Analytical Biochemistry*, **268**(1), 72–78. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.3051>.
105. Kolb, V.A., Makeyev, E.V., & Spirin, A.S. (1994). Folding of firefly luciferase during translation in a cell-free system. *The EMBO Journal*, **13**(15), 3631–3637.
106. Alexandrov, N. (1993). Structural argument for N-terminal initiation of protein folding. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*,

- 2(11), 1989–1991. <https://doi.org/10.1002/pro.5560021121>.
107. Contreras Martínez, L.M., Martínez-Veracochea, F.J., Pohkarel, P., Stroock, A.D., Escobedo, F.A., & DeLisa, M.P. (2006). Protein translocation through a tunnel induces changes in folding kinetics: a lattice model study. *Biotechnology and Bioengineering*, **94**(1), 105–117. <https://doi.org/10.1002/bit.20832>.
108. Huard, F.P.E., Deane, C.M., & Wood, G.R. (2006). Modelling sequential protein folding under kinetic control. *Bioinformatics*, **22**(14), e203–e210. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl248>.
109. Deane, C.M., Dong, M., Huard, F.P.E., Lance, B.K., & Wood, G.R. (2007). Cotranslational protein folding—fact or fiction? *Bioinformatics*, **23**(13), i142–i148. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm175>.
110. Taylor, W.R. (2006). Topological accessibility shows a distinct asymmetry in the folds of beta-alpha proteins. *FEBS Letters*, **580**(22), 5263–5267. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.070>.
111. Lu, H.-M., & Liang, J. (2008). A model study of protein nascent chain and cotranslational folding using hydrophobic-polar residues. *Proteins*, **70**(2), 442–449. <https://doi.org/10.1002/prot.21575>.
112. Fedorov, A.N., & Baldwin, T.O. (1995). Contribution of cotranslational folding to the rate of formation of native protein structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**(4), 1227–1231. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.4.1227>.
113. Fedorov, A.N., & Baldwin, T.O. (1999). Process of biosynthetic protein folding determines the rapid formation of native structure. *Journal of Molecular Biology*, **294**(2), 579–586. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3281>.
114. Shieh, Y.-W., Minguez, P., Bork, P., Auburger, J.J., Guilbride, D.L., Kramer, G., & Bukau, B. (2015). Operon structure and cotranslational subunit association direct protein assembly in bacteria. *Science*, **350**(6261), 678–680. <https://doi.org/10.1126/science.aac8171>.
115. Kramer, G., Patzelt, H., Rauch, T., Kurz, T.A., Vorderwülbecke, S., Bukau, B., & Deuerling, E. (2004). Trigger factor peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity is not essential for the folding of cytosolic proteins in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**(14), 14165–14170. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313635200>.
116. Baram, D., Pyetan, E., Sittner, A., Auerbach-Nevo, T., Bashan, A., & Yonath, A. (2005). Structure of trigger factor binding domain in biologically homologous complex with eubacterial ribosome reveals its chaperone action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 12017–12022. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505581102>.
117. Ferbitz, L., Maier, T., Patzelt, H., Bukau, B., Deuerling, E., & Ban, N. (2004). Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins. *Nature*, **431**(7008), 590–596. <https://doi.org/10.1038/nature02899>.
118. Morgado, L., Burmann, B.M., Sharpe, T., Mazur, A., & Hiller, S. (2017). The dynamic dimer structure of the chaperone Trigger Factor. *Nature Communications*, **8**(1), 1992. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02196-7>.
119. Saio, T., Kawagoe, S., Ishimori, K., & Kalodimos, C. G. (2018). Oligomerization of a molecular chaperone modulates its activity. *ELife*, **7**, e35731. <https://doi.org/10.7554/eLife.35731>.

120. Kaiser, C.M., Chang, H.-C., Agashe, V.R., Lakshminpathy, S.K., Etchells, S.A., Hayer-Hartl, M., Hartl, F.U., & Barral, J.M. (2006). Real-time observation of trigger factor function on translating ribosomes. *Nature*, **444**(7118), 455–460. <https://doi.org/10.1038/nature05225>.
121. Saio, T., Guan, X., Rossi, P., Economou, A., & Kalodimos, C. G. (2014). Structural basis for protein antiaggregation activity of the trigger factor chaperone. *Science*, **344**(6184), 1250494. <https://doi.org/10.1126/science.1250494>.
122. Beckmann, R.P., Mizzen, L.E., & Welch, W.J. (1990). Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science*, **248**(4957), 850–854. <https://doi.org/10.1126/science.2188360>.
123. Gaitanaris, G.A., Vysokanov, A., Hung, S.C., Gottesman, M.E., & Gragerov, A. (1994). Successive action of Escherichia coli chaperones in vivo. *Molecular Microbiology*, **14**(5), 861–869. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01322.x>.
124. Nelson, R.J., Ziegelhoffer, T., Nicolet, C., Werner-Washburne, M., & Craig, E.A. (1992). The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis. *Cell*, **71**(1), 97–105. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90269-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90269-1).
125. Kudlicki, W., Odom, O.W., Kramer, G., & Hardesty, B. (1994). Chaperone-dependent folding and activation of ribosome-bound nascent rhodanese. Analysis by fluorescence. *Journal of Molecular Biology*, **244**(3), 319–331. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1732>.
126. Svetlov, M.S., Kommer, A., Kolb, V.A., & Spirin, A.S. (2006). Effective cotranslational folding of firefly luciferase without chaperones of the Hsp70 family. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, **15**(2), 242–247. <https://doi.org/10.1110/ps.051752506>.
127. Frydman, J., Nimmegern, E., Ohtsuka, K., & Hartl, F.U. (1994). Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature*, **370**(6485), 111–117. <https://doi.org/10.1038/370111a0>.
128. Frydman, J., & Hartl, F.U. (1996). Principles of chaperone-assisted protein folding: differences between in vitro and in vivo mechanisms. *Science*, **272**(5267), 1497–1502. <https://doi.org/10.1126/science.272.5267.1497>.
129. Lorimer, G.H. (1996). A quantitative assessment of the role of the chaperonin proteins in protein folding in vivo. *FASEB Journal*, **10**(1), 5–9. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.1.8566548>.
130. Reid, B.G., & Flynn, G.C. (1996). GroEL Binds to and Unfolds Rhodanese Posttranslationally (*). *Journal of Biological Chemistry*, **271**(12), 7212–7217. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.12.7212>.
131. Schatz, G. (1996). The protein import system of mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**(50), 31763–31766. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.50.31763>.
132. Ying, B.-W., Taguchi, H., & Ueda, T. (2006). Co-translational binding of GroEL to nascent polypeptides is followed by post-translational encapsulation by GroES to mediate protein folding. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**(31), 21813–21819. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603091200>.
133. Ying, B.-W., Taguchi, H., Kondo, M., & Ueda, T. (2005). Co-translational involvement of the chaperonin GroEL in the folding of newly translated polypeptides. *The Journal of Biological Chemistry*,

- 280(12), 12035–12040. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500364200>.
134. Shimizu, Y., Kuruma, Y., Ying, B.-W., Umekage, S., & Ueda, T. (2006). Cell-free translation systems for protein engineering. *The FEBS Journal*, **273**(18), 4133–4140. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05431.x>.
135. Baker, D., & Agard, D.A. (1994). Kinetics versus thermodynamics in protein folding. *Biochemistry*, **33**(24), 7505–7509. <https://doi.org/10.1021/bi00190a002>.
136. Eder, J., Rheinnecker, M., & Fersht, A.R. (1993). Folding of subtilisin BPN': characterization of a folding intermediate. *Biochemistry*, **32**(1), 18–26. <https://doi.org/10.1021/bi00052a004>.
137. Shinde, U.P., Liu, J.J., & Inouye, M. (1997). Protein memory through altered folding mediated by intramolecular chaperones. *Nature*, **389**(6650), 520–522. <https://doi.org/10.1038/39097>.
138. Weissman, J.S., & Kim, P.S. (1992). The pro region of BPTI facilitates folding. *Cell*, **71**(5), 841–851. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90559-u](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90559-u).
139. Dill, K.A., Bromberg, S., Yue, K., Fiebig, K.M., Yee, D.P., Thomas, P.D., & Chan, H.S. (1995). Principles of protein folding--a perspective from simple exact models. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, **4**(4), 561–602.
140. Onuchic, J.N., Wolynes, P.G., Luthey-Schulten, Z., & Socci, N.D. (1995). Toward an outline of the topography of a realistic protein-folding funnel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**(8), 3626–3630. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3626>.
141. Waudby, C.A., Dobson, C.M., & Christodoulou, J. (2019). Nature and Regulation of Protein Folding on the Ribosome. *Trends in Biochemical Sciences*, **44**(11), 914–926. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.06.008>.
142. Fiaux, J., Horst, J., Scior, A., Preissler, S., Koplín, A., Bukau, B., & Deuerling, E. (2010). Structural analysis of the ribosome-associated complex (RAC) reveals an unusual Hsp70/Hsp40 interaction. *The Journal of Biological Chemistry*, **285**(5), 3227–3234. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.075804>.
143. Fedorov, A.N., & Baldwin, T.O. (1997). GroE modulates kinetic partitioning of folding intermediates between alternative states to maximize the yield of biologically active protein. *Journal of Molecular Biology*, **268**(4), 712–723. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1007>.