

## БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Развитие представлений о механизмах сворачивания и разворачивания белков в клетке как составная часть разработки фундаментальной проблемы сворачивания белков. Общие принципы формирования нативной пространственной структуры белка. Обоснование концепции, согласно которой аминокислотная последовательность полипептидной цепи содержит информацию не только о характере ее пространственной структуры, но и о пути формирования этой структуры. Многообразие механизмов сворачивания белков. Понятие об иерархическом пути сворачивания. Фолдоны. Домены как самостоятельные единицы сворачивания. Роль сворачивания-разворачивания при функционировании нативных белков в клетке. "Естественно-развернутые белки". Высокая пластичность таких белков, определяющая многообразие принимаемых ими конформаций, и их роль в процессах внутриклеточной сигнализации. Множественные циклы локального сворачивания - разворачивания как важная особенность функционирования таких белков в клетке.

**Участие междоменных взаимодействий в сворачивании белков.** Междоменные взаимодействия при сворачивании мономера и их функциональное значение. Вопрос о взаимодействии соседних доменов мультидоменного белка в процессе сворачивания.

Междоменные взаимодействия при сворачивании олигомера. Пространственный обмен доменами, обеспечивающий тесное сопряжение между процессами олигомеризации и сворачивания белка. Структурные предпосылки, определяющие способность полипептидной цепи к сворачиванию через стадию обмена доменами. Механизм пространственного обмена доменами; примеры. Функциональные преимущества олигомеров, образованных путем пространственного обмена доменами. Пространственный обмен доменами как механизм образования линейных полимеров и амилоидных структур.

**Особенности сворачивания белков во внутриклеточном окружении.** Макромолекулярный кроудинг. Механизмы, обеспечивающие эффективное сворачивание белков *in vivo*. Котрансляционное сворачивание мультидоменных белков и его преимущества. Проявления котрансляционного сворачивания в клетках прокариот и эукариот. Триггер фактор; его структура и роль на ранних стадиях сворачивания белков, выходящих из канала прокариотической рибосомы. Сигнал-узнающая частица. Ее структура и механизм действия в ходе котрансляционного сворачивания. Котрансляционное сворачивание белков эндоплазматического ретикулума. Механизмы, обеспечивающие контроль качества сворачивания. Шапероны лектиновой природы кальнексин и кальретикулин. Механизмы регуляции скорости и эффективности сворачивания белков в просвете эндоплазматического ретикулума, приводящие к развитию ответа клетки на накопление развернутых белков. Котрансляционное включение белков в мембрану эндоплазматического ретикулума.

**Два типа молекулярных механизмов ускорения сворачивания белков в клетке.** 1. Механизмы, направленные на ускорение медленных стадий сворачивания белков, первичная структура которых содержит полную информацию, необходимую для приобретения нативной пространственной структуры. 2. Механизмы, обеспечивающие сворачивание белков, не способных к самостоятельному сворачиванию, путем передачи им стерической информации, отсутствующей в структуре таких белков. Рассмотрение структуры и каталитических механизмов действия ферментов-фолдаз первого типа – протеин-дисульфид-изомеразы и пептидил-пролил- *цис/транс*-изомеразы. Реакция *цис/транс* изомеризации пролиновых пептидных связей как скорость-лимитирующая стадия образования нативной структуры ряда белков и как механизм перехода между их разными конформационными состояниями. Примеры, иллюстрирующие роль *цис/транс* изомеризации пролинов как молекулярного «переключателя», контролирующего функцию белка в клетке. Катализаторы сворачивания белков второго типа – периплазматический шаперон PapD и про-домен  $\alpha$ -литической протеазы. Их структурные особенности и механизмы стабилизации переходных состояний реакций сворачивания белков-субстратов.

**Основные типы шаперонов.** I. Шапероны, работающие без участия АТФ: предотвращающие агрегацию белков (малые белки теплового шока); доставляющие развернутые белки к месту их постоянной локализации в клетке (SecB); активируемые при экстремальных физиологических состояниях клетки (Hsp33, Hsp31).

II. Шапероны, работающие с участием АТФ. **Шапероны группы Hsp70 и их биологические функции.** Структурные характеристики Hsp70 и его ко-шаперонов в клетках прокариот и в разных компартментах эукариотических клеток. Структура и функции разных доменов молекулы Hsp70. Структура ко-шаперонов бактериальных клеток – DnaJ и GrpE и механизм их действия в комплексах с бактериальным шапероном DnaK. GrpE как молекулярный термосенсор, способный «запирать» белок-мишень в прочном комплексе с DnaK. Каталитический цикл системы DnaK-DnaJ-GrpE в процессе спонтанного сворачивания белка.

Функции Hsp70 и его ко-шаперонов, выходящие за рамки их роли в сворачивании белков. Участие TPR-домена во взаимодействии Hsp70 с различными белками с образованием комплексов, определяющих дальнейшую судьбу полипептида, связанного с шапероном. Роль Hsp70 в посттрансляционном переносе белков через мембраны внутриклеточных органелл. Механизмы транспорта белков через внешнюю и внутреннюю мембраны митохондрий. Митохондриальный Hsp70 как молекулярный мотор транслокации. Модель, описывающая механизм его функционирования. Участие Hsp70 в процессах, направляющих связанные с ним белки на путь деградации.

**Шаперон Hsp90 как специализированный инструмент для сворачивания и стабилизации активного состояния определенных групп белков эукариотической клетки.** Особенности белков-«клиентов» шаперона Hsp90. Мультидоменная структура Hsp90. Механизм димеризации N-концевых доменов и функциональная роль этого процесса. Каталитический цикл шаперона Hsp90 и его отличие от цикла шаперона Hsp70. Характеристика взаимодействия разных типов ко-шаперонов с Hsp90 и механизмов их регуляторного влияния. Hsp90 как «шаперон передачи внутриклеточных сигналов». Участие Hsp90 в транспорте белков во внутреннюю митохондриальную мембрану. Роль этого шаперона в направлении белков на деградацию.

**Шаперонины и их роль в сворачивании белков.** Шаперонины группы I. Структура молекулы GroEL и его ко-шаперонина GroES. Реакционный цикл системы GroEL / GroES. Конформационные изменения, сопровождающие связывание АТФ и GroES и образование закрытой полости для сворачивания белка. Аллостерические эффекты, обеспечивающие согласованное функционирование *цис*- и *транс*- тороидов молекулы GroEL. Рассмотрение механизма, предусматривающего влияние микроокружения закрытой полости GroEL на скорость сворачивания белка. Роль повторных циклов сворачивания-разворачивания в механизме действия шаперонина. Структурные основы температурно-зависимой регуляции работы GroEL. Шаперонин GroEL как универсальная машина сворачивания умеренной эффективности.

Шаперонины группы II. Их структурные отличия от шаперонинов группы I и связанные с этим особенности функциональных циклов. Шаперонин цитозоля эукариотической клетки ССТ. Характеристика его взаимодействия с субстратами. Особенности движения доменов при переходе от открытого к закрытому состоянию. Рассмотрение механизма сворачивания актина и тубулина в полости ССТ. Роль последовательных конформационных изменений, передаваемых внутри кольца, образуемого разными субъединицами, в приобретении белком-субстратом нативного состояния. ССТ как молекулярная машина, приспособленная для решения трудных задач сворачивания белков.

Роль префолдина в обеспечении котрансляционного сворачивания определенной группы белков архебактерий и цитозоля эукариотической клетки. Основные характеристики структурной организации молекулы префолдина и их функциональная роль. Префолдин как фактор, обеспечивающий правильную ориентацию белка-субстрата в комплексе с ССТ. Специфичность

взаимодействия между префолдином и белком-субстратом с одной стороны, и шаперонином и ССТ, с другой. Функции, выполняемые шапероном Skd периплазмы эубактерий, сходным по структуре с префолдином. Представление о новом типе АТР-независимых молекулярных шаперонов- «холдаз».

**Разворачивание и деградация белков в клетке.** Роль разворачивания белков в реализации жизненно-важных внутриклеточных процессов. Источники энергии для разворачивания. Особенности разворачивания белков при их транслокации через мембраны митохондрий - резкое ускорение процесса по сравнению со спонтанным и изменение механизма разворачивания. Роль N-концевой сигнальной последовательности. Молекулярные шапероны семейства Hsp100 (AAA<sup>+</sup>). Структура и механизм действия шаперонов, осуществляющих АТР-зависимую дезагрегацию белков. Принципы структурной организации и функционирования молекулярных машин, способных разворачивать стабильные свернутые белки, несущие соответствующую метку, и осуществлять их деградацию (ClpAP, ClpXP прокариот и протеасомы эукариот). Механизмы, направляющие белки на деградацию. Котрансляционная и посттрансляционная модификации, участие шаперонов Hsp 70 и Hsp 90, а также вспомогательных белков.

Разворачивание белков в составе протеасомы как важный элемент процесса их деградации. Структура прокариотической и эукариотической протеасомы. Роль убиквитиновой цепочки в инициации разворачивания. Аналогия между механизмами «протягивания» полипептидной цепочки через канал во внутренней мембране митохондрий и через протеасомный канал. Структура «шаперонного кольца», осуществляющего разворачивание, и взаимосвязь циклов его функционирования с регуляцией открывания входа в канал, образуемый кольцами протеолитически активных субъединиц. Энергетические затраты, сопровождающие разворачивание и деградацию белков в клетке.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А.В. Финкельштейн и О.Б. Птицын *Физика белка* Москва 2002.
2. *Molecular Mechanisms of Protein Folding* (ed. By R.H. Pain). Oxford University Press, 2000, New York.
3. A. Fersht *Structure and Mechanism in Protein Science. A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W.H. Freeman & Co., 1999.
4. *Molecular Chaperones in the Cell* (Ed. By P. Lund). Oxford University Press, 2001, New York.
5. Н.К. Наградова *Пространственный обмен доменами в гомоолигомерных белках и его функциональное значение*. Биохимия т. 67, с.1013-1025, 2002.
6. Н.К. Наградова *Сворачивание белков в клетке. О механизмах его ускорения*. Биохимия т. 69, с. 1021-1037, 2004.
7. F.U. Hartl and M. Hayer-Hartl *Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein*. Science, v. 295, pp. 1852-1858, 2002.
8. J.C. Young, V.R. Vishwas, K. Siegers and F.U.Hartl *Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol*. Nature Reviews | Molecular Cell Biology v.5, pp.781-791, 2004.
9. J.D. Wang, J.S. Weissman *Thinking outside the box: new insights into the mechanism of GroEL-mediated protein folding*. Nature Struct. Biol. v. 6, pp.597-600, 1999.
10. S. Normark *Anfinsen comes out of the cage during assembly of the bacterial pilus*. PNAS, v. 97, pp. 7670-7672, 2000.
11. S. Prakash and A. Matouschek *Protein unfolding in the cell*. Trends in Biochemical Sciences, v. 29, pp. 593-600, 2004.
12. Z. Kostova and D.H. Wolf *For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection*. EMBO J., v. 22, pp. 2309-2317, 2003.

