

ДИСУЛЬФІДНІ ЗВ'ЯЗКИ У СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІЙ ОРГАНІЗАЦІЇ ПРОТЕЇНІВ

Л. П. УРВАНТ, І. І. ПАТАЛАХ

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: ipatalakh@ukr.net

Обговорюються сучасні уявлення про роль дисульфідного зв'язку в забезпеченні структурно-функціональних властивостей протеїнів плазми крові. Узагальнюються нові підходи до можливостей рефолдингу рекомбінантних і секреторних протеїнів. Розглянуто проблему окисного фолдингу та значення дисульфідного зв'язку для посттрансляційного «дозрівання» секреторних протеїнів у порожнині ендоплазматичного ретикулула з участю редуктазної системи ензимів.

Ключові слова: дисульфідний зв'язок, секреторні протеїни, плазміноген, окисний фолдинг, ренатурація протеїнів.

На сучасному етапі розвитку генної інженерії та технологій виробництва генетично модифікованих сполук, здатних забезпечити спрямоване втручання у протеїновий синтез, особливо гостро постає проблема відтворення у рекомбінантних продуктах тих структурних деталей, які забезпечують увесь спектр функціональних властивостей і регуляторних механізмів, притаманних нативним протеїнам-аналогам. Незважаючи на вражаючі успіхи в галузі генно-інженерних технологій, проблема рефолдингу рекомбінантних протеїнів, що не пройшли етап посттрансляційної модифікації, залишається актуальною [1].

Окремою проблемою є повноцінна структурна реконструкція секреторних протеїнів, які набувають завершеної форми через взаємодію між тіольними групами залишків цистеїну з формуванням внутрішньомолекулярних дисульфідних «зшивок». Значною мірою це стосується штучно синтезованих протеїнових препаратів крові, зокрема рекомбінантних форм тканинного активатора плазміногена (rt-PA) або активованого протеїну С (rAPC).

Проблема відтворення просторової структури постає й тоді, коли визначають обмеження для зворотної денатурації під час препаративного очищення чи зберігання протеїнових препаратів або вивчають умови переведення їх із кристалічного стану в розчин (для виготовлення ін'єкційних лікарських форм). Ще одна важлива проблема — постпрепаративні автопошкодження протеїнових препаратів крові, які спричинюють

незворотну денатурацію чи агрегацію макромолекул, що впливає на якість медичного препарату [2].

Коректний фолдинг, здатний забезпечити нативну структуру водорозчинних протеїнів, є важливим методологічним інструментом хімії білків. Зокрема, це необхідна умова підготовки зразків для проведення рентгеноструктурного аналізу протеїнів чи інших методів вивчення їхньої просторової будови, конформаційних переходів та міжпротеїнових взаємодій [3].

Еволюційно досконалі складні системи супроводження забезпечують процес формування просторової структури протеїну (фолдингу), її посттрансляційну модифікацію, а також захист та реставрацію під час негативних впливів. Подібно до будь-якої біологічної системи, система фолдингу кожної клітини має обмеження щодо своєї ємності — у разі її перевантаження новосинтезований протеїн не встигає отримати завершеної структури. Це — один з патогенетичних механізмів низки автоімунних захворювань.

Особливого значення проблема правильного фолдингу набуває для протеїнів крові, зокрема для протеїнів системи гемостазу, секретованих у судинне русло. Їхня багатодоменна структура підтримується численними дисульфідними містками, які часто виконують ключову роль у функціонуванні системи зсідання — фібринолізу [4]. Цистеїнові залишки у структурі цих протеїнів можуть бути досить чутливими до окисновідновних процесів, які підсилюються за патологічних змін у судинному руслі (розви-

ток запалення, наявність оксидативного стресу). Нещодавно доведено, що деякі дисульфідні зв'язки в структурі плазміногену, тромбомодуліну, тканинного фактора та вітронектину є алостеричними регуляторами їхньої активності [5]. Відомо, що утворення дисульфідних містків є допоміжним процесом *in vivo*, завдяки якому значно стабілізується кінцева конформація протеїнів у позаклітинному середовищі [6].

Таким чином, забезпечення правильного згортання протеїну, синтезованого *de novo*, рефолдинг чи захист нативної структури протеїну в денатурувальних умовах — під впливом несприятливих факторів чи в процесі очищення і виділення — це обов'язкові вимоги, які створюють складні та іноді далекі від вирішення проблеми в технології протеїнових препаратів, у патогенезі судинних захворювань та методології досліджень хімії протеїнів. Сучасні підходи, спрямовані на використання можливостей окисного фолдингу та тіолдисульфідних перетворень, дають новий погляд на перспективу розв'язання цієї проблеми.

Роль дисульфідних груп у підтриманні структури та функцій секреторних протеїнів плазми крові

Серед функціональних груп протеїнових молекул сірковмісні групи вирізняються високою реакційною здатністю та різноманітністю хімічних реакцій. До цих груп належать сульфгідрильна (тіольна) група цистеїну, дисульфідна група цистину та тіоефірна група метіоніну. Вони можуть вступати в хімічні реакції широкого спектру, включаючи реакції алкілювання, ацилювання, окиснення, тіолдисульфідного обміну, утворення напівмеркапталів, меркаптидів, меркаптолів та комплексів з перенесенням заряду.

Реакційна здатність SH-груп у нативних протеїнах варіює в широких межах. За цією ознакою розрізняють три типи тіольних груп: легкодоступні, менш доступні та «замасковані» [7]. SH-групи першого типу легко вступають у реакцію з нітропрусидом та м'якими окисниками (феричіанідом, йодобензоатом). Тіольні групи другого типу не дають нітропрусидної реакції і взаємодіють з досить сильними окисниками (йодом) та меркаптоутворювальними агентами. До «замаскованих» належать тіольні групи, які вдається виявити лише після денатурації протеїну.

Існують два загальні типи дисульфідних зв'язків: структурні та функціональні. Як

традиційно вважали донедавна, лише структурними є дисульфідні зв'язки, що належать протеїнам, секретованим у кров. Внутрішньомолекулярні дисульфідні «зшивки» додатково стабілізують нативну конформацію секреторних протеїнів у позаклітинному оточенні. Вважають, що структурні SS-зв'язки, які утворюються під час тіолдисульфідних переходів при ренатурації чи посттрансляційному процесингу, сприяють коректному фолдингу протеїну, зменшуючи ентропію його незгорненої форми [8].

Деякі дисульфідні зв'язки у структурі секреторних протеїнів виконують функціональну роль. Існує два типи функціональних дисульфідів — каталітичні та алостеричні.

Каталітичний зв'язок на цей час добре вивчено. Він є типовим для активних сайтів ензимів, які забезпечують тіолдисульфідний обмін в інших протеїнах. Ці ензими належать до класу оксидоредуктаз [9]. Алостеричні зв'язки виявили зовсім недавно [10]. Встановлено, що вони контролюють функціонування протеїну через ключову роль у формуванні його активної/неактивної конформації, забезпечуючи зміну структури шляхом відновлення чи окиснення [10, 11]. Тип зміни залежить від протеїну. Це може бути конформація, що описана для HIV-рецептора, CD4 [12]. Інший шлях реалізується, коли утворені під час руйнування алостеричного зв'язку тіоли стають сайтами алкілювання для модифікуючих агентів (тканинний фактор)(рис. 1) [13, 14]. Дії дисульфідів з каталітичними та алостеричними функціями взаємозв'язані, оскільки редокс-стан алостеричних дисульфідів контролюється каталітичними [12, 14, 15]. Нещодавно було проведено дослідження з метою ідентифікації спільного структурного мотиву алостеричних дисульфідів, вивчення просторового розміщення та послідовності дисульфідного зв'язку за допомогою рентгеноструктурного аналізу [11].

Дисульфідний зв'язок утворюється шістьма атомами, що містяться між двома атомами α -вуглецю сусідніх залишків цистеїну: $C\alpha-C\beta-S\gamma-S\gamma'-C\beta'-C\alpha'$. Ці шість атомів визначають п'ять кутів обертання (χ) навколо відповідних зв'язків. Залежно від напрямку обертання χ_1 та χ_1 існує 20 можливих конфігурацій дисульфідного зв'язку. Розрізняють позитивні та негативні кути χ , які позначаються знаком «+» чи «-» [16]. Фізико-хімічні властивості дисульфідів залежать від знака кута χ_3 .

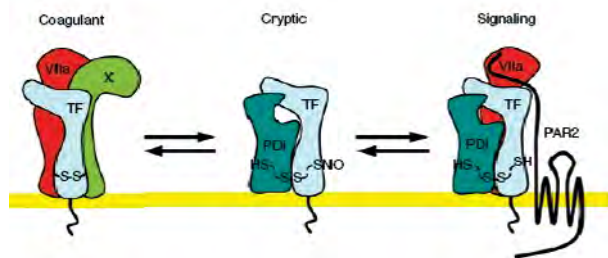


Рис. 1. Модель переходу між латентним, коагулянтним і сигнальним конформаційним станом тканинного фактора внаслідок руйнування алостеричного зв'язку [6]

Залежно від знака кутів χ_2 , χ_3 та χ_2' формуються 3 конфігурації дисульфідного зв'язку — спіраль (spiral), гачок (hook) чи скрепка (staple). Дисульфіди типу спіралі є основними структурними дисульфідами, досить інертними стосовно хімічних взаємодій. Зв'язки двох останніх типів достатньо легко руйнуються, однак механізми і наслідки цього розриву різні: -Hook-дисульфіди мають дуже енергетично напружений зв'язок, що підвищує його нестабільність і можливість руйнації, але не впливає на просторову структуру протеїну; дисульфідам з конформацією -Staple притаманні окисно-відновні перетворення, які змінюють геометрію поверхні молекули.

За декількома винятками всі каталітичні дисульфіди — це +/-RH-зв'язки типу -Hook, тоді як відомі алостеричні дисульфіди — -RH-дисульфіди типу -Staple [12]. Для RH-Staple-зв'язку характерним є близьке розташування α -атомів вуглецю двох цистеїнових залишків, задіяних у його формуванні. Відстань між ними становить 4,3 Å, порівняно з 5,6 Å для інших дисульфідів. Це пояснюється їхнім розташуванням у протеїнової структурі: зв'язки цього типу поєднують сусідні антипаралельні ланцюги β -складок вторинної структури [11, 18]. Утім, існує думка, що домінування RH-форм є лише методичним артефактом, адже за певних умов підготовки зразків у них ідентифікуються також LH-форми SS-зв'язку [6].

Велика кількість тромботичних та тромболітичних протеїнів мають один чи декілька дисульфідних зв'язків типу -RH-Staple. Тканинний фактор (ТФ) був першим протеїном гемостазу, для якого встановлено здатність алостеричного зв'язку Cys186–Cys209 контролювати взаємодію з проксимальним доменом фібронектину 3-го типу на мембрані [6].

На клітинній поверхні ТФ може існувати у трьох формах (рис. 1). Латентна (cryptic)

форма протеїну є неактивною. Коагуляційна — швидко зв'язує фактор VIIa та ініціює зсідання крові. Сигнальна форма ТФ зв'язує фактор VII та гідролізує протеазоактивований рецептор 2, який бере участь у процесах запалення, канцеро- та ангіогенезу. Відновлення та окиснення Cys186–Cys209 дисульфідного зв'язку є центральною подією у перетворенні трьох форм тканинного фактора. Редокс-стан зв'язку контролюється протеїновою дисульфідізомеразою та оксидом азоту [6]. Плазміноген, вітронектин, глікопротеїн 1b α , інтегрин β_3 та тромбомодулін також містять -RH-Staple-дисульфіди. Очевидно, що значне ускладнення структури протеїна, які беруть участь у каскаді зсідання–фібриноліз, пов'язано, передусім, з їхньою поліфункціональністю і складною системою регуляції. За останніми даними, саме RH-Staple-конформація протеїнових дисульфідів забезпечує можливість алостеричної регуляції активності цих протеїнів шляхом руйнування/утворення відповідних SS-зв'язків.

Дисульфідні зв'язки відіграють важливу роль у забезпеченні фолдингу та функціонуванні секреторних протеїнів. Ці зв'язки є критичними в стабілізації кінцевої структури протеїну, оскільки помилкове спарювання цистеїнів може заважати протеїнам досягнути нативної конформації або навіть призвести до неправильної укладки поліпептидного ланцюга. Традиційно вважають, що зворотно денатуровані протеїни з переведенням їх у відповідне середовище відновлюють вихідну конформацію. Однак, процес денатурації не лише сприяє небажаному зближенню окремих реакційноздатних груп, експонуванню раніше прихованих амінокислотних залишків, а й спричинює утворення нових ковалентних зв'язків [2]. Наявність вільних тіолів полегшує перебіг реакцій тіолдисульфідного обміну з утворенням нових міжмолекулярних дисульфідних зв'язків, внаслідок чого відбувається агрегація протеїнів. Обов'язковою додатковою умовою прискорення утворення «правильних» дисульфідних містків є оптимізація оточення: окисно-відновний стан буфера, температура, сполуки-деагреганти та стабілізатори вторинної структури. Відомо, наприклад, що плазміноген людини легко утворює агрегати в кислому середовищі, які майже не розчинні в нейтральному середовищі.

Дисульфідні зв'язки у структурі плазміногена

Плазміноген (Pg) — основний компонент системи фібринолізу. Pg людини складається з трьох структурно відмінних частин (рис. 2):

1) N-кінцевої ділянки, яка ще називається преактиваційним пептидом, відповідно від Glu-1 до Lys-77. Існує думка, що повнорозмірна конформація Pg забезпечує захист від активації [19];

2) п'яти гомологічних доменів (крингли) від Lys-78 до Arg-561 — важкий ланцюг плазміногена. Крингли, зокрема, забезпечують взаємодію з лігандами;

3) каталітичний домен від Val-562 до Asn-791 — легкий ланцюг з типовою сериною протеазою.

Непротеазна частина Pg, протромбіну та урокінази (uPA), на відміну від проензимів панкреатичних серинових протеаз, є досить великою за довжиною і має складну будову. Встановлено, що вона виконує важливі функції, зокрема бере участь у механізмі регулювання активації Pg та плазміногену (Pn) з фібрином, α_2 -антиплазміном і ω -амінокарбоксікислотами [20]. Вона також залучається до контролю перетворення протромбіну на тромбін, забезпечує біологічну специфічність та контроль рівня Pn, тромбіну

й uPA, участь у Ca^{2+} -опосередкованому зв'язуванні протромбіну з фосфоліпідами мембран, в асоціації протромбіну з фактором V_a . Багатогранність функції непротеазної частини відображається в її структурі, яка поділяється на дискретні структурно-функціональні одиниці. Найбільш складною та впорядкованою є доменна будова кринглів — гомологічних ділянок, що мають форму петлі, зафіксованої трьома дисульфідними зв'язками.

Крингли (K) — одиниці автономного згортання [20], до якого залучається близько 80 амінокислотних залишків, при цьому утворюються дисульфідні зв'язки характерного типу: C1–C6, C2–C4, C3–C5 (рис. 3). Pg та фактор росту гепатоцитів — єдині протеїни, що додатково мають дисульфідні містки між кринглами (K2 та K3). Крингломени характеризуються високим вмістом бета-структур. В основі їх формування лежать взаємодії, які сприяють зближенню дисульфідних містків внутрішньої петлі молекули та їх компактизації за рахунок ван-дер-ваальсових контактів, що загалом створює дисульфідний кластер: Cys87–Cys124 і Cys115–Cys139 (на прикладі амінокислотної послідовності крингла протромбіну). Цей дисульфідний кластер схований у структурі крингла біля центра його

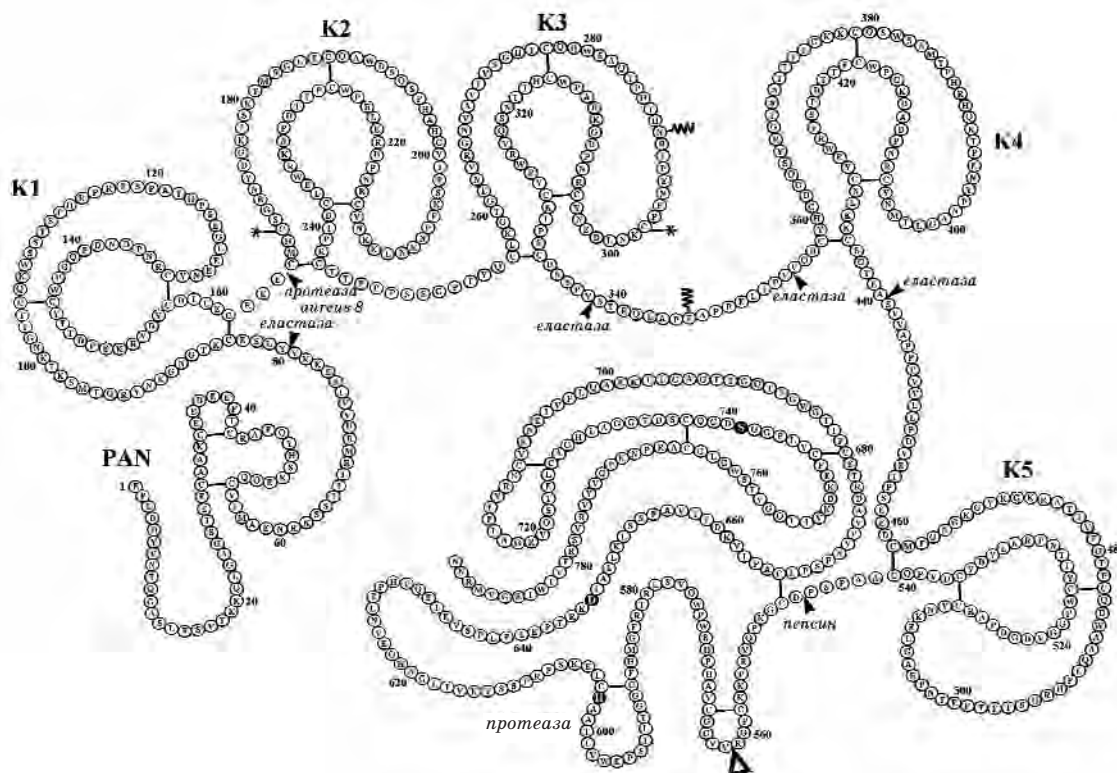


Рис. 2. Структура плазміногена [20]

тяжіння, а тому є недоступним для дії розчинників. Амінокислоти, що містяться біля внутрішньої петлі, зберігають високу ступінь консервативності (до 50% консервативних амінокислот відносно загальної кількості їх у структурі крингла).

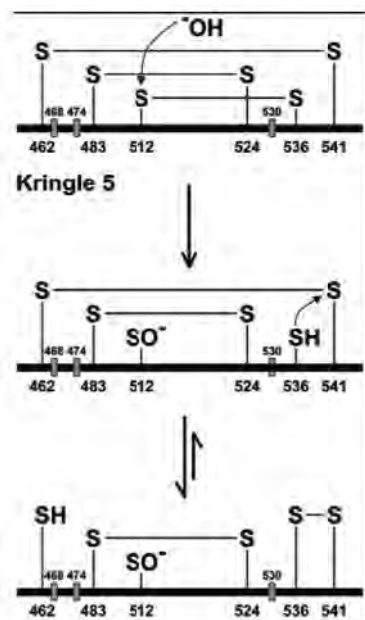


Рис. 3. Дисульфідні зв'язки у структурі крингла плазміногена (на прикладі п'ятого крингла) [21]

Протеїни, що містять крингли, трапляються переважно в системі зсідання крові та фібринолізу: Pg — 5 копій, tPA та протромбін — 2, uPA та фактор XII –1, фактор росту гепатоцитів та фактороподібний протеїн людини — 38. Первинна структура всіх відомих кринглів характеризується високим ступенем гомології. Однак функціональна значущість їх різна. Так, найбільш вивчений K1 протромбіну не несе жодного функціонального навантаження при активації протромбіну в тромбін. Він скоріше відіграє роль структурного «спейсера» між N-кінцевим Гла-доменом, який забезпечує зв'язування молекули протеїну з поверхнею фосфоліпиду, і функціонально значущим K2, який зв'язується з важким ланцюгом фактора Va протромбіназного комплексу, забезпечуючи зближення субстрату з ферментом.

Крингли молекул Pg та tPA залучаються до формування ділянок зв'язування з компонентами фібринолітичної системи, такими як фібрин та α_2 -антиплазмін. K1, K4 і K5 Pg та K2 tPA здатні зв'язувати фібрин, лізин, ω -амінокарбонові кислоти й ϵ -амінокапронову кислоту. K5 плазміногена та лег-

кий ланцюг плазміну зв'язуються з бензамідом. Функції інших кринглів поки що лишаються нез'ясованими.

Із застосуванням рентгеноструктурного аналізу вивчено тривимірну структуру деяких кринглів Pg людини (K1) [21], (K4, K5) [22], tPA людини (K2), бичачого протромбіну (K1 та K2), 37-го K4-типу крингла аполіпропротеїну; за допомогою ядерно-магнітного резонансу — Pg людини (K1 і K4), кінський Pg (K4), tPA людини (K2), uPA [24]. Виявлено два RH-Stapl дисульфідних зв'язки в протеазному домені Pn: Cys680–Cys747 та Cys737–Cys765 [25]. Досліджено механізм автолізу Pn з утворенням фрагментів ангіостатину (K1-4, K1-4,5 та K1-3), який відбувається лише за умови попереднього розривання зв'язків Cys462–Cys541 та Cys512–Cys536. Доведено участь гідроксильних іонів у цьому процесі (рис. 3), показано можливість ензимативного гідроксилювання у нейтральному середовищі та спонтанного — у лужному [21]. Висунуто гіпотезу, за якою спочатку відновлюється RH-Stapl-зв'язок у протеолітичному домені Pn, він стає медіатором відновлення дисульфідних зв'язків у п'ятому кринглі, змінює просторову конформацію активного центру та ініціює автопротеоліз Pn [6].

Існування редокс-контролю активності ензимів на рівні клітинного сигналіngu експериментально підтверджено для ряду цитозольних і трансмембранних протеїнів (рецепторів, факторів транскрипції, деяких мітогенів і регуляторів апоптозу). Можливість такого типу регуляції часто забезпечується за рахунок зворотності окисно-відновних станів, притаманних SH-групам цистеїну. Оскільки цитозоль — це відновлене середовище (у парі GSH/GSSG переважає відновлений глутатіон), для клітинної редокс-регуляції характерні транзиторні (нетривалі) переходи з відновленого стану протеїнових тіолів в окиснений. У клітинах існує спеціальний механізм коректного рефолдингу таких дисульфідів, пов'язаний з утворенням змішаних дисульфідів. У плазмі крові, яка є окисним середовищем, цистеїнвмісні протеїни містяться у формі високомолекулярних дисульфідів. Утім, принципова здатність відновлення таких зв'язків існує, як показано, наприклад, для плазміну. Процес забезпечує фермент плазмін-редуктаза, яка відновлює за дисульфідними зв'язками Cys461–Cys540 і Cys511–Cys535 5-го крингла в умовах окисного редокс-стану плазми. Можливо, подібний механізм незабаром буде знайдено й для інших секреторних протеїнів.

Механізм і послідовність окисного фолдингу протеїнів в еукаріотів

Більшість *de novo* синтезованих протеїнів набуває завершеної форми шляхом пост-трансляційних модифікацій, у тому числі за рахунок реакцій тіолдисульфідного обміну. Коректний фолдинг — це важлива умова повноцінного виконання протеїном його функцій. Тому еволюційно було створено складні системи супроводження процесу формування просторової структури, її збереження та реставрації. Первинний фолдинг клітинних протеїнів відбувається в цитозолі клітин, секреторні протеїни набувають кінцевої конформації в ендоплазматичному ретикулумі (ЕПР) та на поверхні плазматичної мембрани. Про те, наскільки різного оточення потребує фолдинг цих двох груп протеїнів, свідчить значна відмінність редокс-та іонного складу середовища цитозолу та порожнини ЕПР. Відповідно у цих двох компартментах існують дві різні системи шаперонів [26].

Показово, що обидві шаперонові сітки мають цистеїнекспоновані ділянки, чутливі до окисно-відновного стану середовища, втім їхня відповідь на редокс-зміни у середовищі є прямо протилежною і залежить від відповідного редокс-стану цитозолу (відновного) чи ЕПР (більш окисненого). Зокрема, цитозольний шаперон Hsp33 у відповідь на зміни редокс-рівноваги в більш окисненій стан (в умовах температурного чи окисдативного стресу) формує активні димери. Це механізм формування «пам'яті» клітини про стрес: фолдинг протеїнів відбувається лише у присутності Hsp33, денатуровані молекули здатні відновлювати свою структуру лише у присутності додаткового комплексу шаперонів. Натомість, одна з оксидоредуктаз ЕПР, протеїнова дисульфідізомераза (ПДІ) виявляє шаперонподібну активність лише у відновленому стані. Активні тіольні групи цистеїнів у її структурі виконують функцію молекулярного «перемикача»: з їхньою участю контролюється фолдинг та обернено модифікуються структура й функції відповідного протеїну. Редокс-регуляція шляхом окиснення цистеїнів використовується такою гнучкою системою, як система фосфорилування протеїнів. Її головне призначення — модифікація субстратів для підвищення їхньої специфічності та забезпечення роботи сигнального каскаду. Більш того, цистеїни, залучені до різних модифікацій (сульфенових, сульфінних, дисульфідних та нітрозотіольних), можуть утворювати своєрідний молекулярний код,

який швидко передає та приймає інформацію про редокс-зміни в середовищі.

Утворення дисульфідів є спонтанним процесом. Для невеликого поліпептиду цього достатньо для досягнення нативного стану *in vitro* [27]. Однак поряд з іншими аспектами згортання протеїнів, дисульфідна частина фолдингу проходить повільно, оскільки залежить від реакцій окиснення-відновлення, яким потрібен акцептор електронів. Це вказує на те, що дисульфідна ланка фолдингу є допоміжним процесом на шляху формування просторової структури протеїну *in vivo* [28].

В еукаріотів окисний фолдинг протеїнів відбувається в ЕПР. Утворення «правильних» дисульфідних зв'язків забезпечують декілька протеїнів ЕПР. З використанням класичного субстрату рибонуклеази А було ідентифіковано протеїнову дисульфідізомеразу та доведено її каталітичну здатність перебудовувати дисульфідні зв'язки шляхом їх утворення та відновлення *in vitro* [29]. Схоже, що внутрішньоклітинні ПДІ виконують аналогічну функцію, однак лишається невідомим, як ЕПР звільняється від електронів, що з'являються в результаті утворення дисульфідів. Протягом останніх 40 років було проаналізовано велику кількість різних факторів, здатних підтримувати окисне середовище ЕПР, вибірккову секрецію відновлених тіолів та захоплення окиснених тіолів, відкрито велику кількість різних редокс-ензимів та малих молекул-окисників [30]. Тим не менш, фізіологічне відношення їх до окисного фолдингу лишається недоведеним через нестачу генетичних доказів.

Нещодавно завдяки генетичним дослідженням дріжджів було ідентифіковано асоційований з мембраною ЕПР консервативний протеїн ЕПР оксидоредуктин 1 (Ero1p) — обов'язковий компонент системи окисного фолдингу [31, 32]. Мутантні форми ERO1 є чутливими до дії дитіотриітолу та акумулюють в ЕПР протеїни, що в нормі містять дисульфідні зв'язки у відновленому стані. *In vivo* мембранна асоціація Ero1p зберігає протеїн в ЕПР та полегшує котрансляційне формування дисульфідів. Ero1p містить 7 структурних консервативних залишків цистеїну, які, ймовірно, каталізують передачу електронів [31–33].

Ero1p не гомологічний жодному з відомих редокс-ензимів чи протеїнів узагалі. Відповідно до ролі в підтриманні фолдингу протеїнів в ЕПР, Ero1p дріжджів та hERO1-L β індуються сигналом про присутність незгорнених протеїнів [4, 31, 32].

Відомо, що ПДІ сприяє утворенню дисульфідних зв'язків. Було показано, що цей ензим каталізує формування, ізомеризацію та відновлення дисульфідних зв'язків у широкому спектрі субстратів *in vitro* [34], однак його роль *in vivo* залишалася недостатньо вивченою. ПДІ — це життєво необхідний протеїн, вміст якого становить $\approx 2\%$ від усіх протеїнів ЕПР та має 2 аналогічні тіоредоксину активні сайти Cys-Gly-His-Cys (CGHC) [29, 35]. Відкриття того, що мутації в активному сайті Cys-Gly-His-Ser призводять до виникнення чутливості до дитіотреїтолу, доводить, що ПДІ виконує роль у формуванні дисульфідних зв'язків *in vivo* [35]. Така мутантна ПДІ не може функціонувати як окисник протеїнів, однак здатна каталізувати ізомеризацію протеїнових дисульфідів. Наразі ці дослідження підтверджують, що основною функцією ПДІ є руйнування невласливих протеїну дисульфідних зв'язків [36]. Результати дослідів з чутливим до дії дитіотреїтолу мутантним фенотипом суперечать факту, що ПДІ відіграє головну роль у сприянні утворенню дисульфідів. Більш того, у мутантів за Ero1-1 ПДІ накопичується у відновленій формі. Це вказує на той факт, що Ero1p діє раніше за ПДІ у ланцюгу формування дисульфідів в ЕПР [37].

Нещодавно було проведено дослідження *in vitro* для вивчення Ero1p-опосередкованого утворення дисульфідів, де серед протеїнових компонентів використовували лише Ero1p та ПДІ [38]. Окисний фолдинг субстратів, каталізований Ero1p, проходить швидше у присутності оптимального відновлювального буфера з глутатіоном, ніж фолдинг за участю ПДІ. Більш того, Ero1p-залежна реакція може відбуватися незалежно від глутатіону *in vivo* та *in vitro* [38, 39]. Мутантна ПДІ з Cys-Gly-His-Ala- активним сайтом (CGHA) виступає домінантним інгібітором реакції, каталізованої Ero1p з утворенням змішаного дисульфиду *in vivo* та *in vitro*. Ці дослідження доводять, що Ero1p окиснює ПДІ завдяки дисульфідному обміну. ПДІ у свою чергу каталізує утворення дисульфідів у протеїнах у процесі фолдингу. Ero1p безпосередньо не здатен ефективно окиснювати субстрати у процесі їх фолдингу, а тому потребує ПДІ для передачі окисних еквівалентів на субстрати [38]. Таким чином, передача окисних еквівалентів забезпечується двома протеїнами: Ero1p та ПДІ (рис. 4). Ця система може бути надзвичайно корисною для рефолдингу рекомбінантних дисульфідвмісних протеїнів. Ero1p може також виступати посередником у процесах зворотної

транслокації протеїнів до цитозолу завдяки здатності окиснювати ПДІ, змінювати її конформацію, а відтак і спорідненість до певних субстратів [40]. Незважаючи на здатність каталізувати низку тіолдисульфідних реакцій, ПДІ існує переважно в окисненій формі *in vivo* [37], що передбачає її основну клітинну функцію — здійснювати окисний фолдинг протеїнів завдяки Ero1p.

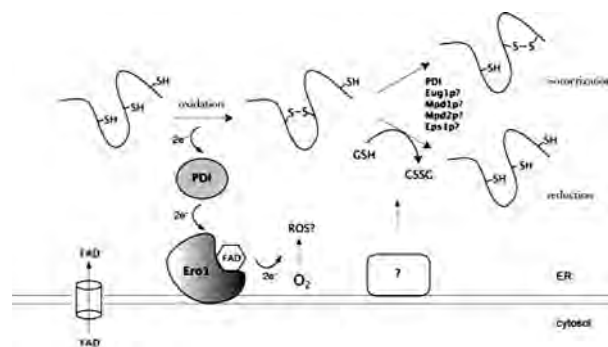


Рис. 4. Схематична модель окисного фолдингу протеїнів в ЕПР дріжджів [40]

Нездатність Ero1p до взаємодії з деякими ізомерами ПДІ свідчить про різницю між ПДІ та її гомологами. Така перевага дозволяє різним ПДІ-подібним протеїнам функціонувати як дисульфідізомерази чи редуктази, яким у їхніх тіоредоксинподібних активних сайтах потрібні залишки цистеїну для упакування (рис. 3). Імовірно, що й сама ПДІ також здатна до дисульфідної ізомеразії та згортання *in vivo*. Для бактерій показано, що роль цих ПДІ-схожих протеїнів продиктована здатністю до взаємодії з низкою оксидаз чи редуктаз швидше, ніж редокс-потенціал їхніх активних сайтів. Деякі з еукаріотичних гомологів ПДІ можуть також зберігатись у відновленій формі вищезазначеними редуктазами. Вирішення способу взаємодії ПДІ-подібних протеїнів з Ero1p дозволить визначити їхню роль у клітині.

Окисний фолдинг як спосіб реставрації дисульфідних зв'язків *in vitro*

Відомо, що велика кількість рекомбінантних технологій базується на застосуванні *Escherichia coli* для надекспресії протеїнів. Утім, значна кількість отриманих таким способом протеїнів накопичується у вигляді нерозчинних внутрішньоклітинних агрегатів (тільця включення). Зазвичай такі протеїнові агрегати солюбілізують детергентами або денатурувальними агентами, а потім переносять у відповідну буферну

систему для ренатурації, додатково розчиняючи чи діалізуючи. Цей процес у багатьох випадках спричинює суттєві втрати, зумовлені неправильною ренатурацією або агрегуванням. Тому в таких випадках доцільно застосовувати «хелпери фолдингу» (поліетиленгліколь, гліцерол, детергенти, аргінін тощо), а також деякі процедури, які сприятимуть успішному рефолдингу.

Зокрема, використовують афінні сорбенти для пришивання денатурованого протеїну з наступним обробленням його ренатуруючим буферним розчином. Цей спосіб не лише запобігає агрегації, а й концентрує цільовий протеїн на матриці. Недоліком цього методу є підвищена здатність до преципітації на поверхні сорбенту [3].

Інший підхід заснований на пошуку оптимального оточення для рефолдингу, який орієнтується, передусім, на підвищення розчинності. Однак цей критерій не є досконалим, оскільки можуть утворюватися розчинні мікроагрегати або частково ренатуровані інтермедіати, які не відрізняються від нативних протеїнів. Тому, аби попередити агрегацію, експерименти з рефолдингу виконують на дуже розведених розчинах.

Отже, проблема штучного рефолдингу протеїнів, як підтверджує експериментальна практика, цілком доступна для розв'язання, проте універсальних схем майже не існує: наприклад, для двох фосфатаз з досить подібною первинною структурою (65% ідентичності послідовностей) та просторовою конформацією продуктивність рефолдингу в ідентичних умовах розрізнялась у два рази.

Ефективність рефолдингу визначається синергічними ефектами тих інгредієнтів, які входять до складу реакційної суміші, а саме відновлювальними агентами, тіолмодифікуючими ензимами, полярними та неполярними сполуками, різноманітними детергентами, сполуками типу шаперонів та шаперонінів.

У масштабному дослідженні впливу 14 параметрів на рефолдинг 33 протеїнів було встановлено, що найпотужніший позитивний ефект створювали 2 фактори: рН буфера та окисно-відновні сполуки [1]. Кожен протеїн мав свій достатньо вузький діапазон оптимуму рН, втім, узагальнюючи, можна стверджувати, що існує 4 рівні рН, за якими можна класифікувати протеїни за рН-специфічністю рефолдингу. Стосовно відновників (окисників) такої закономірності не виявлено, оскільки їхні ефекти були виключно протеїнспецифічними. Спектр ре-

докс-активних сполук охоплює як традиційні відновники (дитіотреїтол, глутатіон GSH:GSSG та меркаптоетанол), так і альтернативні сучасні: дитіол ВМС (bis-mercaptoacetamide cyclohexane) та нетіоловий відновник ТСЕР (tris(2-carboxyethylphosphine)). Протеїни, які мають у структурі дисульфідні містки, найбільш ефективно ренатурували в присутності ВМС (ефект якого виявився навіть кращим за глутатіон, дія якого до цього часу найширше вивчалась). ВМС є міметиком ПДІ, яка підвищувала ефективність рефолдингу як *in vitro*, так й *in vivo* [42].

Можливість ренатурації цистеїнзбагачених протеїнів досліджується вже протягом 30 років. Ще в досліджах з використанням хімотрипсिनогену як модельної молекули [43] було встановлено, що рефолдинг шляхом реокиснення зруйнованих дисульфідних містків відбувається з появою молекул у двох станах: повністю реставрованому, тобто нативному, та у вигляді гетерогенних агрегатів. Було показано, що часткова денатурація без розриву SS-зв'язків є повністю оберненою, ренатурація відбувається швидко й повністю, при цьому агрегати не детектуються. Відновлена структура залишається високорезистентною до дії низьких концентрацій денатуруючих агентів (1,2 М гуанідин-НСl). Натомість, глибока денатурація є оберненою лише частково. Співвідношення нативного й агрегованого станів може бути різним, що залежить, передусім, від концентрації протеїну. Утім, ще на досліджах з рибонуклеазою було зроблено висновок про неможливість переходів між цими двома станами: агреговані молекули не можуть ренатурувати, а повністю ренатуровані — не агрегують. Який шлях чекає на молекулу — до ренатурації чи до агрегації, вирішується на ранніх стадіях рефолдингу. Повністю денатурований поліпептидний ланцюг може «колапсувати» у компактну глобулярну структуру за рахунок потужних гідрофобних взаємодій.

Цей процес відбувається раніше, ніж утворюються дисульфідні зшивки. Проте він сприяє стеричному наближенню залишків цистеїну, здатних утворювати дисульфідний місток. Шляхом неправильного фолдингу забезпечується перебір варіантів утворення ковалентної пари з найменшою з можливих енергією зв'язку, що гарантує його підвищену стабільність.

Частина денатурованих поліпептидних ланцюгів не встигає утворити глобулу, оскільки контактує гідрофобними поверхнями

і «злипається», утворюючи агрегати різного розміру. Вочевидь, застосування окисно-відновних агентів не спроможне загальмувати чи відмінити цей процес. Однак у цьому разі доцільним може бути застосування детергентів та дезагрегантів.

Отже, нові дані щодо ролі дисульфідного зв'язку в структурно-функціональній організації протеїнової молекули відкривають широкі перспективи для розвитку сучасних підходів у медицині та хімії протеїну. Змінюючи усталені уявлення про інертність SS-зв'язків у складі секреторних протеїнів, зокрема протеїнів системи гемостазу, вони дозволяють з нових позицій оцінювати патогенез та регуляторні можливості цієї систе-

ми. Нові підходи розширюють можливості окисного фолдингу та рефолдингу протеїнів, збагачених на цистеїн; уможливають контроль якості протеїнових препаратів в умовах їх виробництва та зберігання; дають поштовх для створення удосконалених версій протеїнів чи нових структур із заданими властивостями. Можливо, у недалекій перспективі на основі тіолдисульфідних модифікацій буде створено принципово нові синтетичні «самозбірні» протеїни із запрограмованою функціональністю. Існують прогнози щодо реальності створення у майбутньому «нанороботів», поява яких зумовить справжню технологічну революцію, у тому числі й у медицині.

ЛІТЕРАТУРА

1. Willis M. S., Hogan J. K., Prabhakar P. et al. Investigation of protein refolding using a fractional factorial screen: A study of reagent effects and interactions // *Protein Sci.* — 2005. — V. 14. — P. 1818–1826.
2. Шевель М. В., Вережка С. В. Автоповреждение белковых препаратов: молекулярные механизмы и пути предотвращения // *Совр. пробл. токсикол.* — 2006. — №3. — С. 41–45.
3. Scheich C., Niesen F. N., Seckler R., Buussow K. An automated in vitro protein folding screen applied to a human dynactin subunit // *Protein Science.* — 2004. — V. 13. — P. 370–380.
4. Pagani M., Pilati S., Bertoli G. et al. The C-terminal domain of yeast Ero1p mediates membrane localization and is essential for function // *FEBS Lett.* — 2001. — V. 508. — P. 117–120.
5. Паталах І. І., Урвант Л. П., Євстратова І. Н. та ін. Білкові тіол-дисульфідні плазми: роль в атерогенезі // *Лаб. діагностика.* — 2008. — №46. — С. 11–19.
6. Chen V. M., Hogg P. J. Allosteric disulfide bonds in thrombosis and thrombolysis // *J. Thromb. and Haemost.* — 2006. — V. 4. — P. 2533–2541.
7. Vanhegyi G., Csala M., Szarka A. et al. Role of ascorbate in oxidative protein folding // *BioFactors.* — 2003. — V. 17, N1–4. — P. 37–46.
8. Торчинский Ю. М. Сера в белках. — М.: Наука, 1977. — 303 с.
9. Thornton J. M. Disulfide bridges in globular proteins // *Mol. Biol.* — 1981. — V. 151, N2. — P. 261–287.
10. Nakamura H. Thioredoxin and its related molecules // *Antioxid. Redox Signal.* — 2005. — V. 7, N5–6. — P. 823–828.
11. Hogg P. J. Disulfide bonds as switches for protein function // *Trends Biochem. Sci.* — 2003. — V. 28, N4. — P. 210–214.
12. Schmidt B., Hogg P. J. Allosteric disulfide bonds // *Biochemistry.* — 2006. — V. 45, N24. — P. 7429–7433.
13. Matthias L. J., Yam P. T., Jiang X. M. et al. Disulfide exchange in domain 2 of CD4 is required for entry of HIV-1 // *Nat. Immunol.* — 2002. — V. 3, N8. — P. 727–732.
14. Chen V. M., Ahamed J., Versteeg H. H. et al. Evidence for activation of tissue factor by an allosteric disulfide bond // *Biochemistry.* — 2006. — V. 45, N39. — P. 12020–12028.
15. Ahamed J., Versteeg H. H., Kerver M. et al. Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling // *Proc. Nat. Acad. Sci.* — 2006. — V. 103, N38. — P. 13932–13937.
16. Markovic I., Stantchev T. S., Fields K. H. Tiol/disulfide exchange is a prerequisite for CXCR4-tropic HIV-1 envelope-mediated T-cell fusion during viral entry // *Blood.* — 2004. — V. 103, N5. — P. 1586–1594.
17. Richardson J. S., Richardson D. C. Prediction of protein structure and the principles of protein conformation // Edited by: Fasman G.D. — New York, Plenum Press, 1989. — P. 1–99.
18. Wouters M. A., Lau K. K., Hogg P. J. Cross-strand disulfides in cell entry proteins: poised to act // *Bioessays.* — 2004. — V. 26, N1. — P. 73–79.
19. Violand B. N., Byrne R., Castellino F. J. The effect of α -, ω -amino acids on human plasminogen structure and activation // *J. Biol. Chem.* — 1978. — V. 253. — P. 5395–5401.
20. Trexler M., Patthy L. Proc. Folding autonomy of the kringle 4 fragment of human plasminogen // *Natl. Acad. Sci.* — 1983. — V. 80. — P. 2457–2461.
21. Lay A. J., Jiang X.-M., Daly E. et al. Plasmin Reduction by Phosphoglycerate Kinase Is a

- Thiol-independent Process // *J. Biol. Chem.* — 2002. — V. 277, N11. — P. 9062–9068.
22. *Mathews I. I., Vanderhoff-Hanaver P., Castellino F. J., Tulinsky A.* Crystal structures of the recombinant kringle 1 domain of human plasminogen in complexes with the ligands ϵ -aminocaproic acid and *trans*-4-amino(methyl) cyclohexane-1-carboxylic acid // *Biochemistry.* — 1996. — V. 35. — P. 2567–2576.
 23. *Chang Y., Mochalkin I., McCance S. G. et al.* Structure and ligand binding determinants of the recombinant kringle 5 domain of human plasminogen // *Ibid.* — 1998. — V. 37. — P. 3258–3271.
 24. *Byeon I.-J. L., Llina's M.* Solution structure of the tissue-type plasminogen activator kringle 2 domain complexed to 6-aminohexanoic acid, an antifibrinolytic drug // *J. Mol. Biol.* — 1991. — V.222. — P. 1035–1051.
 25. *Wang X., Terzyan S., Tang J. et al.* Human plasminogen catalytic domain undergoes an unusual conformational change upon activation // *Ibid.* — 2000. — V. 295. — P. 903–914.
 26. *Sitia R., Molteni S. N.* Stress, Protein (Mis)folding, and Signaling: The Redox Connection // *Sci. STKE (Science Signal / The signal transduction knowledge environment).* — 2004. — V. 2004, N. 239. — P. 27.
 27. *Anfinsen C. B., Haber E., Sela M., White F. H.* The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1961. — V. 15, N47. — P. 1309–1314.
 28. *Bardwell J., Lee J., Jander G. et al* A pathway for disulfide bond formation in vivo // *Ibid.* — 1993. — V. 90. — P. 1038–1042.
 29. *Goldberger R. F., Epstein C. J., Anfinsen C. B.* Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver // *J. Biol. Chem.* — 1963. — V. 238. — P. 628–635.
 30. *Ziegler D. M., Poulsen L. L.* Protein disulfide bond synthesis: a possible intracellular mechanism // *Trends Biochem. Sci.* — 1977. — V.2. — P. 79–81.
 31. *Frand A. R., Kaiser C. A.* The *ERO1* gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum // *Mol. Cell.* — 1998. — V. 1. — P. 161–170.
 32. *Pollard M. G., Travers K. J., Weissman J. S.* Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum // *Ibid.* — 1998. — V. 1. — P. 171–182.
 33. *Frand A. R., Kaiser C. A.* Two pairs of conserved cysteines are required for the oxidative activity of Ero1p in protein disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum // *Mol. Biol. Cell.* — 2000. — V. 11. — P. 2833–2843.
 34. *Freedman R. B.* Protein disulfide isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins // *Cell.* — 1989. — V. 57. — P. 1069–1072.
 35. *Holst B., Tachibana C., Winther J. R.* Active site mutations in yeast protein disulfide isomerase cause dithiothreitol sensitivity and a reduced rate of protein folding in the endoplasmic reticulum // *J. Cell. Biol.* — 1997. — V. 138. — P. 1229–1238.
 36. *Laboissiere M. C., Sturley S. L., Raines R. T.* The essential function of protein-disulfide isomerase is to unscramble non-native disulfide bonds // *J. Biol. Chem.* — 1995. — V. 270. — P. 28006–28009.
 37. *Frand A. R., Kaiser C. A.* Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum // *Mol. Cell.* — 1999. — V. 4. — P. 469–477.
 38. *Tu B. P., Ho-Schleyer S., Travers K. J., Weissman J. S.* Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum // *Science.* — 2000. — V. 290. — P. 1571–1574.
 39. *Cuozzo J. W., Kaiser C. A.* Competition between glutathione and protein thiols for disulphide-bond formation // *Nat. Cell Biol.* — 1999. — V. 1. — P. 130–135.
 40. *Tsai B., Rapoport T. A.* Unfolded cholera toxin is transferred to the ER membrane and released from protein disulfide isomerase upon oxidation by Ero1 // *J. Cell. Biol.* — 2002. — V. 159. — P. 207–216.
 41. *Tu B. P., Weissman J. S.* Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences // *Ibid.* — 2004. — V. 164, N3. — P. 341–346.
 42. *Woycechowsky K. J., Raines R. T.* Native disulfide bond formation in proteins // *Curr. Opin. Chem. Biol.* — 2000. — V.4. — P. 533–539.
 43. *Orsini G., Goldberg M. E.* The Renaturation of Reduced Chymotrypsinogen A in Guanidine HCl // *J. Biol. Chem.* — 1978. — V. 253, N10. — P. 3453–3458.

**ДИСУЛЬФИДНЫЕ СВЯЗИ
В СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ
ОРГАНИЗАЦИИ ПРОТЕИНОВ**

Л. П. Урвант, И. И. Паталах

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

E-mail: ipatalakh@ukr.net

Обсуждаются современные представления о роли дисульфидной связи в обеспечении структурно-функциональных свойств протеинов плазмы крови. Обобщаются новые подходы к возможностям рефолдинга рекомбинантных и секреторных протеинов. Рассмотрены проблема окислительного фолдинга и значение дисульфидной связи для посттрансляционного «созревания» секреторных протеинов в эндоплазматическом ретикулуме с участием редуктазной системы энзимов.

Ключевые слова: дисульфидная связь, секреторные протеины, пламиноген, окислительный фолдинг, ренатурация протеинов.

**DISULFIDE BONDS
IN STRUCTURAL AND FUNCTIONAL
PROTEIN ORGANIZATION**

L. P. Urvant, I. I. Patalakh

Palladin Institute of Biochemistry of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: ipatalakh@ukr.net

Modern vision about disulfide bonds role in light of providing the structural and functional properties of blood plasma proteins is proposed. New approaches concerning recombinant and secretory proteins refolding are generalized. A problem concerning oxidative folding and disulfide bonds significance for secretory protein posttranslation ripening inside of endoplasmic reticulum with reductase enzyme system participation is discussed.

Key words: disulfide bonds, secretory proteins, plasminogen, oxidative folding, proteins renaturation.