

# SBALOVÁNÍ PROTEINŮ: STAV PROBLEMATIKY NA KONCI TISÍCILETÍ

MARTIN ŠVEC a JIŘÍ VONDRÁŠEK

Ústav organické chemie a biochemie, Flemingovo nám. 2, Praha 6; e-mail: svecm@marilyn.uochb.cas.cz, vond@rosemary.uochb.cas.cz

Došlo dne 7.X.1999

Klíčová slova: sbalování proteinů

## Obsah

1. Úvod
2. Je sbalování řízeno termodynamicky nebo kineticky?
3. Domény a subdomény jako jednotky sbalení
4. Modely sbalování proteinů
5. Meziprodukty, molten globule
6. Časná fáze sbalování
7. Střední a pozdní fáze sbalování
8. Pravidla sbalování proteinů *in vitro*
9. Sbalování proteinů *in vivo*
10. Závěr

## 1. Úvod

Pochopení procesu vytváření prostorové struktury (sbalování) proteinů stále zůstává jednou ze základních nezodpovězených otázek současné molekulární biologie. Přestože procesy vedoucí k syntéze polypeptidového řetězce (transkripce a translace) jsou známy relativně dobře, stále nejasné zatím zůstává, jak syntetizovaný polypeptidový řetězec dosahuje své trojrozměrné struktury, která dává nakonec vznik nativnímu funkčnímu proteinu.

Studium systémů *in vitro* a *in vivo* přináší v současnosti stále větší množství informací a rychlý pokrok v instrumentaci nabízí velké možnosti pro charakterizaci meziproduktů, které při sbalování vznikají. Objevení molekulových chaperonů (z anglického „chaperone“, česky gardedáma) pak vedlo k porovnávání mechanismů sbalování proteinů probíhajících *in vivo* a *in vitro*.

Znalost procesu sbalování je žádoucí jak pro průmyslovou produkci proteinů, tak pro syntézu nových proteinů. V neposlední řadě by pochopení mechanismů, řídících vytváření nativní struktury proteinů, mohlo pomoci v léčbě řady chorob (nemoc šílených krav, Creutzfeldova-Jakobsova choroba) způsobených chybným sbalením proteinů.

## 2. Je sbalování řízeno termodynamicky nebo kineticky?

Z pokusů prováděných Anfinsenem<sup>1,2</sup> *in vitro* na ribonukleaze zřetelně vyplývá, že proces sbalování proteinu je vratný

a tedy, že veškerá informace, nezbytná k dosažení nativní konformace proteinu, je obsažena v sekvenci aminokyselin.

Důsledkem tohoto tzv. Anfinsenova postulátu je fakt, že sbalování proteinů je řízeno termodynamicky<sup>3</sup>. To znamená, že při sbalování spěje molekula proteinu do příslušného minima volné energie. Protože ale počet konformací, které může polypeptidový řetězec zaujmout, je astronomicky vysoký, potom náhodné „prohledávání“ všech možných uspořádání (vedoucí tak k nalezení nativní konformace) by vyžadovalo neúměrné množství času, které by bylo i v rozporu s experimentálně pozorovanou dobou nutnou pro sbalení proteinu. Tento zdánlivý rozpor se nazývá Levinthalův paradox<sup>4</sup> a jeho důsledkem je hypotéza, že nativní struktura proteinu je pod termodynamickou kontrolou, avšak její dosažení předchází tvorba meziproduktů, jejichž vznik je řízen kineticky.

Tuto hypotézu v sobě odráží model kineticky řízeného sbalování proteinů<sup>4,5</sup>. V něm je Levinthalův paradox překonán tím, že sbalování probíhá skrze tvorbu několika nukleačních center (segmentů s uspořádanou strukturou) v různých částech polypeptidového řetězce. Tvorba nukleačních center je realizována interakcemi krátkého a středního dosahu, které tak iniciují a řídí proces sbalování. Vznik nukleačních center v počáteční fázi sbalování tak značně omezuje počet konformací, které může polypeptidový řetězec následně při sbalování zaujmout.

Podobný model přechodu souboru denaturovaných molekul do nativního stavu představil Wolynes<sup>6</sup>. V modelu tzv. „sbalovací nálevky“ je sledován průběh změny volné energie při sbalování proteinu, který vede s nápadnou snadností skrze komplikovaný energetický profil. Z modelu vyplývá, že rychlost sbalování je zpomalována „záhyby“ v energetickém profilu (odpovídající lokálním minimům energie), které odpovídají formování přechodně stabilních meziproduktů. Směrem ke dnu nálevky klesá jak množství možných konformací, tak entropie polypeptidového řetězce. Čím strmější je sklon stěn nálevky, tím je sbalování rychlejší.

V současnosti obecně převažuje názor, že vytváření trojrozměrné struktury proteinů je řízeno termodynamicky, avšak probíhá skrze kineticky kontrolovanou tvorbu částečně uspořádaných meziproduktů.

## 3. Domény a subdomény jako jednotky sbalení

Na existenci kompaktně zformovaných globulárních částí bílkovin v zásadě nezávislých na struktuře ostatních částí molekuly, upozornil poprvé Wetlaufer<sup>5,7</sup>. Později se pro tyto útvary vžil název domény.

Řada experimentů potvrdila, že domény jsou schopny samostatného sbalování, nezávisle na ostatních částech polypeptidového řetězce<sup>7-16</sup>. Například domény glyceralddehydhydrogenasy<sup>12</sup> vážící NAD<sup>+</sup>, domény aspartátaminotransferasy<sup>13</sup> a pankreatické elastasy<sup>16</sup> vážící fosfát. N- a C-terminální domény kvasinkové fosfoglycerátkinasy mají kvazinativní strukturu<sup>17,18</sup>. Obecně lze říci, že samostatné domény se sbalují rychleji, než jsou-li integrovány v molekule<sup>19</sup>.

Ačkoli jsou některé domény schopné samostatného sbalování, jejich schopnost vytvořit aktivní protein byla pozorována pouze v několika málo případech (např. u thioredoxinu<sup>20</sup>, elastasy<sup>16</sup> a methionyl-t-RNA synthetasy<sup>21</sup>). Správné sbalení domén tedy není dostačující podmínkou pro vytvoření funkčního proteinu, nutná je i jejich kontinuita, která zajišťuje stabilitu celého proteinu<sup>22</sup>.

Vzhledem k výskytu shodně organizovaných domén v různých proteinech i v rámci jedné molekuly (někdy i bez homologie v primární struktuře) se předpokládá, že hrály důležitou roli v evoluci proteinů. Diskutovaným mechanismem je duplikace a fúze genů<sup>23</sup>.

V souvislosti s diskusí o doménách se dále nabízí otázka, zda by mohly existovat fragmenty na nižší strukturní úrovni než domény (tzv. subdomény), které by byly schopny samostatného sbalování. Termín subdoména je zde používán pro jednotku sbalené struktury, která je větší než helix nebo  $\beta$ -struktura, ale zároveň menší, než celá doména<sup>26</sup>. Například C-terminální fragmenty thermolysinu se sbalují autonomně, jestliže mají velikost alespoň tří helixů nebo jsou větší<sup>24,25</sup>. K podobným závěrům došli Oas a Kim<sup>26</sup> v experimentech s fragmenty BPTI, které se samostatně sbalovaly a následně spojovaly. Předpokládá se, že tyto subdomény jsou kondenzované stavy polypeptidového řetězce, ve kterých ještě nedošlo k úplnému těsnému sbalení atomů hydrofobního jádra. Proti tomuto názoru mluví některé experimenty s fragmenty menšími než doména, například z SH2 domény proteinů p60 a p85 (cit.<sup>14,15</sup>), s F2 fragmenty z bakteriální nukleasy<sup>27-29</sup>, tryptofan synthasy nebo cytochromu c (cit.<sup>30</sup>), u nichž nebylo samostatné sbalování pozorováno.

#### 4. Modely sbalování proteinů

Sbalování by bylo relativně snadno vysvětlitelné za předpokladu, že by každá aminokyselina dosáhla svou správnou konformaci nezávisle na ostatních nebo pouze za účasti interakcí krátkého dosahu. Tento předpoklad je ale v rozporu s realitou, neboť opomíjí interakce dlouhého dosahu, které se při sbalování uplatňují a jsou nezbytné pro stabilitu terciární nativní konformace.

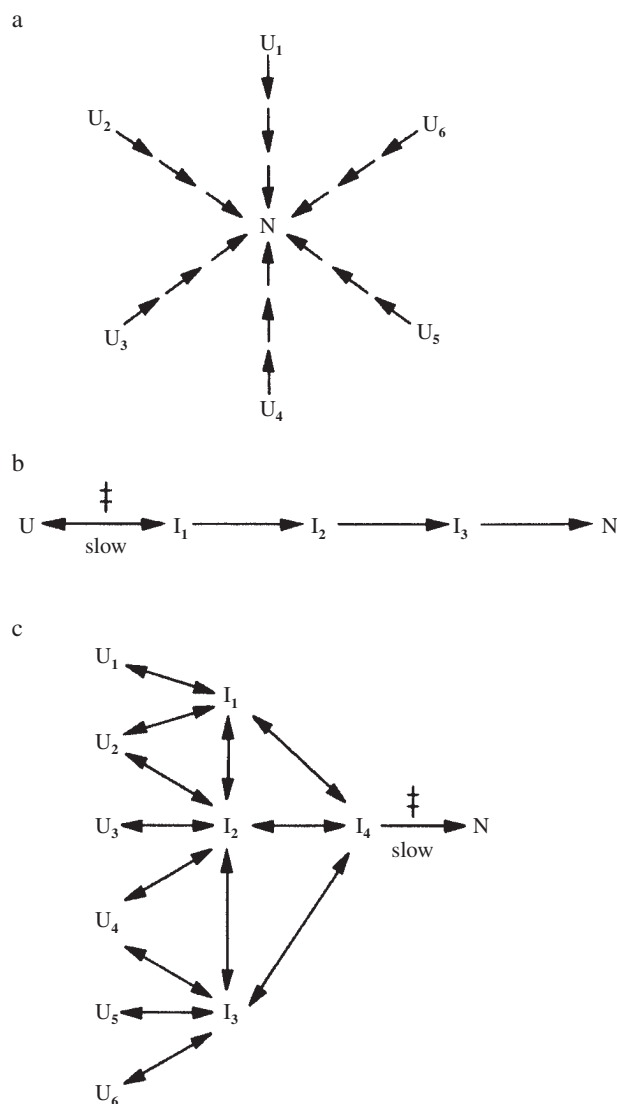
Velmi kontroverzní otázkou je, zda existuje pouze jedna jedinečná cesta, kterou se sbalování proteinu ubírá nebo zda je jich více. Jestliže má každá molekula proteinu na počátku sbalování jinou konformaci, pak je možné se domnívat, že každá sleduje svou jedinečnou cestu sbalení (obr. 1a). Jako analogii si můžeme představit skládání dětské skládačky (z angl. „jigsaw puzzle“)<sup>31</sup>. Ačkoli při každém skládání připojujeme jednotlivé díly v různém pořadí, vždy (za předpokladu, že postupujeme správně) dojdeme ke stejnému cíli. Nedostatkem takového modelu je, že v sobě zahrnuje nesprávný předpoklad, totiž že nativní sbalenou konformaci proteinu určují pouze interakce krátkého dosahu.

Oproti tomu se zdá, že modely zahrnující tvorbu určitého počtu meziproductů, které vedou k jedné nativní konformaci, vystihují celý proces věrohodněji (obr. 1b).

Prvním z nich byl model nukleace-propagace<sup>5,32,33</sup>, ve kterém díky fluktuacím dochází na různých místech v polypeptidovém řetězci ke vzniku segmentů s uspořádanou strukturou (nukleace), které sice nejsou stabilní, ale slouží jako templát pro další sbalování (propagace).

Difuzně-kolizně-adhezní model předpokládá, že jednotlivé elementy nativní konformace proteinu, jako jsou například  $\alpha$ -helixy a  $\beta$ -struktury, jsou v denaturovaném proteinu nestabilní a tedy přítomné jen s malou pravděpodobností. Při vhodných interakcích se ale mohou tyto struktury navzájem stabilizovat a vytvářet soudržnější útvary. Rychlostní konstanta pro vznik takovýchto útvarů je dána součinem rychlosti, se kterou se dané prvky mísí, a pravděpodobnosti, že budou vhodně orientovány. Dynamika denaturovaného polypeptidového řetězce ukazuje, že se jeho různé části srážejí vlivem difuze přibližně  $10^{+3}$  krát za sekundu<sup>34</sup>. Při pravděpodobnosti  $10^{-5}$ , že jsou oba segmenty ve vhodné orientaci, je pak hodnota rychlostní konstanty sbalování shodná s pozorovanou hodnotou řádově  $1.s^{-1}$  (cit.<sup>41</sup>).

Další model, tzv. postupné hierarchické sbalování proteinu, navrhl Schulz<sup>35</sup>. Předpokládal, že sbalování probíhá stup-



Obr. 1. U – denaturovaný protein, I – meziproduct, N – nativní protein (a) model sbalování proteinů, v němž každá molekula sleduje svou jedinečnou cestu sbalení, (b) model sbalování proteinů, zahrnující tvorbu určitého množství meziproductů, (c) obecný model sbalování proteinů zahrnující v sobě oba předcházející modely<sup>41</sup>

ňovitě v závislosti na strukturní hierarchii, tedy že po nukleaci se tvoří sekundární struktury, které se spojují a dávají vzniknout supersekundárním strukturám, potom doménám a nakonec celému aktivnímu monomeru. U složeného proteinu dojde v poslední fázi k uspořádání podjednotek a tím k finálním konformačním úpravám, které dají vznik funkčním vlastnostem proteinu.

V tzv. „frame work“ modelu<sup>36</sup> se tvorba nativní struktury uskutečňuje sestavováním již existujících elementů sekundárních struktur, které přežívají denaturaci. Tyto elementy mají značnou stabilitu a nejobtížnějším krokem sbalování je jejich sestavování dohromady. Je dokázáno, že např.  $\alpha$ -helix se tvoří v každém denaturovaném polypeptidu během mikrosekund<sup>34</sup>, ale zaniká ještě rychleji; rovnovážná konstanta pro jeho tvorbu je tedy menší než jedna. Otázkou zůstává, v jakém stadiu se tedy  $\alpha$ -helix stává stabilním. Ale jak velká stabilita je již významná? Jedním z nejstabilnějších známých  $\alpha$ -helixů je aminokonec ribonukleasy A, a ačkoli je v denaturovaném proteinu hojně zastoupen, stabilizován je až v konečné fázi sbalování<sup>37</sup>.

Další možný způsob sbalování je, že polypeptid podstoupí v renaturačních podmínkách rychlý kolaps realizovaný převážně hydrofobními interakcemi (tzv. hydrofobní kolaps)<sup>38</sup>, a dosáhne tak poměrně kondenzovaného stavu. Takovéto stínění polypeptidového řetězce může pak zvýšit pravděpodobnost, že při probíhající srážkách dosáhne nativní struktury<sup>39</sup>. Formování sekundárních struktur by mohlo probíhat s hydrofobním kolapsem i současně<sup>40</sup>.

Obecný mechanismus sbalování proteinů, navržený podle zatím dostupných experimentálních dat<sup>41</sup> můžeme vidět na obr. 1c. Tzv. model dětské skládačky (obr. 1a) se uplatní pravděpodobně v počáteční fázi sbalování. Jeho výsledkem není protein s nativní strukturou, ale pouze několik částečně sbalených meziproductů. Poté, pravděpodobně stejným mechanismem, jako v difuzně-kolizně-adhezním nebo „frame work“ modelu, dojde za pomoci hlavně hydrofobních a vodíkových vazeb ke stabilizaci elementů nativní struktury<sup>41</sup>. Sbalování je posléze ukončeno vytvořením nativní struktury proteinu.

## 5. Meziproducty, molten globule

V současné době se při řešení problému sbalování proteinů klade velký důraz na zkoumání vlastností meziproductů, jejichž tvorba byla při sbalování řady proteinů pozorována<sup>42-48</sup>.

Detekce a charakterizace meziproductů, která je považována za jednu z podmínek úspěšného řešení mechanismu sbalování, je znesnadněna rychlostí a kooperativitou tohoto procesu a z toho vyplývajícím faktem, že meziproducty mají obecně velmi krátkou životnost. Navzdory tomu byla uskutčněna řada pokusů detekce a charakterizace přechodných stavů při sbalování proteinů. Díky technickému pokroku posledních let dnes existují metody, které lze pro studium sbalování proteinů použít, např. NMR, využívající rychlé výměny vodík-deuterium a spojená s rychlým mícháním<sup>49</sup>. Často používanou metodou je také studium proteinových fragmentů<sup>26,50</sup>. Metody proteinového inženýrství umožňují stabilizaci meziproductů a zkoumání chování různých částí proteinu během sbalování<sup>51,52</sup>.

U mnoha proteinů byla v časně fázi sbalování prokázána tvorba sekundárních struktur<sup>53,54</sup>. Ohgushi a Wada<sup>55</sup> pozorovali

při sbalování řady proteinů vznik meziproductů s podobnými vlastnostmi, které nazvali molten globule (MG). Molten globuli charakterizovali jako poměrně kompaktní útvar s vysokým množstvím nativních sekundárních struktur a s fluktuující terciární strukturou. Obsahuje přístupná hydrofobní místa, na která se může vázat hydrofobní barvivo anilinaftalensulfonát. Molten globule byla poté pozorována při sbalování řady proteinů, např.  $\alpha$ -laktalbuminu<sup>48</sup>,  $\beta$ -laktamasy<sup>56</sup>, karboanhydrazy<sup>57</sup>,  $\alpha$ -podjednotky<sup>58</sup> a  $\beta$ -podjednotky tryptofansynthasy<sup>59</sup>, hovězího růstového hormonu<sup>60</sup> a kvasinkové fosfoglycerátkinasy<sup>52</sup>.

Velmi diskutovanou otázkou je, zda jsou sekundární strukturní prvky, přítomné v molten globuli, shodné s nativními. Například analyzovaná molten globule  $\alpha$ -laktalbuminu obsahuje zformovanou helikální doménu se slabými hydrofobními interakcemi, zatímco  $\beta$ -struktura je značně neuspořádaná. Pozorován v ní byl i hydrofobní útvar vytvářený postranními řetězci Tyr103, Trp104 a His107, jehož struktura byla jen nepatrně odlišná od té, která je pozorována v nativním proteinu<sup>61</sup>. Vytváření prvků nativní sekundární struktury bylo také pozorováno při sbalování cytochromu c (cit.<sup>51</sup>), barnasy<sup>62</sup> a slepičího lysozymu<sup>63</sup>. Naopak tvorba nenativních sekundárních struktur byla pozorována při renaturaci  $\beta$ -laktoglobulinu<sup>64</sup>.

U řady proteinů byly identifikovány meziproducty, které předcházely tvorbě molten globule<sup>36,59,65,66</sup>. Tyto útvary, později nazvané pre-molten globule<sup>66</sup>, obsahují značné množství fluktuujících sekundárních motivů, jsou méně kompaktní, ale stejně jako molten globule vykazují přítomnost hydrofobních oblastí přístupných rozpouštědлу.

Mnohem podstatnější otázkou zůstává, zda je tzv. molten globule meziproduct, přes který se sbalování odehrává podle následujícího schématu,

denaturovaný protein → molten globule → nativní protein,

či zda stojí mimo cestu sbalování a je tedy pouze strukturou proteinu, která je preferována v daných renaturačních podmínkách:

denaturovaný protein → nativní protein



molten globule<sup>67</sup>.

Podobné úvahy se mohou týkat i meziproductů, u kterých není přesvědčivě dokázáno, že jsou pro sbalování důležité<sup>67</sup>.

Model molten globule, jako obecného meziproductu odmítá A. L. Fink<sup>68</sup>, který nepopírá existenci meziproductů, ale zdůrazňuje, že vzhledem k tomu, že prostorová struktura proteinu je určena sekvencí jeho aminokyselin, obecný meziproduct nemůže existovat, a že každý protein tvoří při sbalování svůj specifický meziproduct s jedinečnou strukturou.

## 6. Časná fáze sbalování

Proces sbalování proteinu by mohl být iniciován hydrofobním kolapsem, který způsobí kondenzaci polypeptidového řetězce. Poté následuje vznik sekundárních struktur, které jsou neustále přeskupovány<sup>69</sup> a které mohou sloužit jako nukleační jádra. Je také možné, že tyto dva procesy probíhají současně<sup>70</sup>.

Teorii hydrofobního kolapsu v časně fázi sbalování podporuje řada experimentálních dat<sup>52,63,71,72</sup>.

V mnoha proteinech byly pozorovány mikrostruktury přezívající denaturaci, které by mohly tvořit nukleační jádra pro následné sbalování. Například Neri<sup>73</sup> detegoval přítomnost hydrofobních útvarů v denaturovaném represoru. Tvorbu hydrofobních shluků objevil Mathews<sup>71</sup> během renaturace dihydrofolát-reduktasy. Výskyt zbytkových lokálních struktur v denaturovaném proteinu pozoroval Logan et al.<sup>74</sup> Pomocí fluorescenční emisní spektrometrie byl během renaturace fosfoglycerátkinasy a jejích mutantů zjištěn výskyt zbytkových mikrostruktur, které se skládaly z hydrofobních shluků<sup>52</sup>. Je tedy možné, že sbalování proteinu začíná hydrofobním kolapsem doprovázeným tvorbou nativních nebo nenativních sekundárních struktur. Tyto mikrostruktury mohou tvořit nukleační centra v procesu sbalování proteinu.

V každém případě v časně fázi procesu vznikne heterogenní populace částečně sbalených meziproductů, které jsou ve fluktuující rovnováze<sup>75</sup> a které mohou mít i multimerní povahu. Takové meziproducty byly například pozorovány během renaturace fosfoglycerátkinasy<sup>76,77</sup>, kde se rychle tvořily přechodné multimerní meziproducty, které poté, během pomalého stadia sbalování, dávaly vzniknout nativnímu proteinu. Narozdíl od klasických agregátů (shluků), je ale jejich výskyt nezávislý na koncentraci, objevují se i při koncentracích proteinu 0,05  $\mu\text{M}$ . Multimerní meziproducty (dimery, trimery a tetramery) byly také pozorovány při renaturaci N-terminálních fragmentů fosfoglycerolkinasy v rovnovážných podmínkách<sup>72</sup>.

Kinetické metody, které se v současnosti používají k detekci meziproductů, jsou omezeny časovým rozsahem na milisekundy. V počátcích sbalování proteinů probíhají pravděpodobně velmi rychlé události, které jsou mimo tento experimentální dosah. Pro pochopení mechanismu sbalování proteinů je nezbytné porozumět právě těmto velmi časným událostem, které iniciují celý proces.

## 7. Střední a pozdní fáze sbalování

Ve střední fázi sbalování byla pozorována tvorba vazebných míst pro substrát nebo ligand. Například vazebná místa pro ionty  $\text{Ca}^{2+}$  v  $\alpha$ -laktalbuminu jsou vytvářena ještě před zformováním nativního proteinu<sup>78</sup>. Podobně byla pozorována tvorba nativních epitopů u  $\beta$ -podjednotky tryptofansynthasy<sup>79</sup>.

V poslední fázi procesu protein dosáhne svou nativní konformaci a u enzymů se objeví aktivita. Dojde k přesnému uspořádání sekundárních struktur<sup>80</sup>, správnému sbalení hydrofobního jádra<sup>81</sup>, u oligomerních proteinů se uspořádají podjednotky<sup>36</sup>, u multidoménových proteinů se jednotlivé domény řádně spárují<sup>8</sup> a přeskupí se disulfidové vazby<sup>82</sup>. Sbalování proteinů je v této fázi řízeno nekovalentními interakcemi a disulfidové vazby hrají pouze roli stabilizační.

Krokem, který omezuje rychlost poslední fáze sbalování, je u řady proteinů izomerizace prolinu<sup>83</sup>. Přibližně 60 % proteinů obsahuje v nativním stavu nejméně jednu *cis*X-Pro vazbu. Izomerizace prolinu byla popsána Brandtsem<sup>83</sup>, který pomocí tohoto jevu vysvětloval pomalé fáze sbalování a existenci dvou denaturačních forem ribonukleasy A (cit.<sup>84</sup>). Role izomerizace prolinu byla postupně přijímána. Levitt<sup>85</sup> navr-

hoval existenci tří druhů prolinu. První, který neovlivňuje sbalování, druhý, který snižuje jeho rychlost a třetí, který sbalování blokuje. Nicméně izomerizace prolinu nemůže být považována za proces vlastní pouze poslední fázi sbalování<sup>72</sup>.

## 8. Pravidla sbalování proteinů *in vitro*

Je zřejmé, že úplné pochopení mechanismů ovládajících přechod proteinu do své nativní struktury bude ještě vyžadovat mnoho vědeckého úsilí a experimentů. Na závěr můžeme pravidla sbalování proteinů, odvozená z dosud provedených *in vitro* studií, shrnout do tří bodů:

1. sbalování proteinu je v daném prostředí řízeno jeho primární strukturou (Anfinsenův postulát),
2. nativní struktura proteinu je pod termodynamickou kontrolou a odpovídá minimu Gibbsovy volné energie,
3. sbalování většiny proteinů provází vznik částečně sbalených meziproductů, které jsou kontrolovány kineticky.

## 9. Sbalování proteinů *in vivo*

Dlouhou dobu se předpokládalo, že nově syntetizované proteiny se *in vivo* sbalují samy a stejným mechanismem, jako *in vitro*. Poslední výzkumy ale naznačují zcela jasně, že sbalování proteinů do jejich nativních konformací *in vivo*, stejně jako skládání podjednotek při tvorbě oligomerních struktur vyžaduje v mnoha případech pomoc dalších látek bílkovinné povahy zvaných molekulové chaperony<sup>86,87</sup>.

Podle Anfinsena<sup>1,2</sup> je informace obsažená v sekvenci aminokyselin nezbytnou a postačující podmínkou pro zajištění funkční konformace proteinu, která je zároveň strukturou s nejnižší volnou energií. Ke správnému sbalení tedy není třeba žádné další informace ani vnější energie.

Molekulové chaperony interagují se vznikajícími, stresem-destabilizovanými nebo přemísťovanými proteiny a zabráňují tak jejich nesprávnému sbalení a následnému srážení. Nemohou ale interagovat s nativními proteiny, ani nejsou schopny správně sbalit již jednou zformované sráženy bílkovin. Chaperony také nenesou informaci, která by umožnila proteinu dosáhnout jiné konformace, než jaká je mu dikována sekvencí aminokyselin<sup>88,89</sup>. Molekulové chaperony pouze zvyšují výtěžek, ale nikoli rychlost reakce sbalování. Z tohoto pohledu tedy nejsou katalyzátory a jejich funkce nezpochybňuje platnost Anfinsenova postulátu (viz výše).

Chaperony pravděpodobně nejsou schopny vázat se na úplně rozbalený polyproteinový řetězec. Spíše se zdá, že se přechodně váží na časný meziproduct, který vzniká při sbalování proteinu<sup>72</sup>. Tímto časným meziproductem by mohla být i molten globule nebo také tzv. pre-molten globule<sup>72</sup>. V každém případě tento časný intermediát obsahuje velké hydrofobní oblasti a je pravděpodobné, že se na chaperon váže právě skrze ně. K uvolnění proteinu je v některých případech zapotřebí hydrolýzy ATP. Získaná energie je použita k realizaci konformačních změn chaperonu, které uvolní protein<sup>90</sup>.

Experimenty se sbalováním proteinů prováděné *in vitro* naznačují, že špatné sbalování a následné srážení proteinu je důsledkem kompetice mezi správným a chybným sbalením. Ukázalo se, že chaperony nejsou třeba, je-li v buňce preferováno formování správné struktury. To se potvrdilo i u oligo-

merních proteinů. Z tohoto pohledu se jeví jako velmi zajímavé sbalování p22Arc represorového dimeru, kde sbalovací proces za účasti chaperonu byl pomalejší než neasistované sbalování, tzn. bez účasti chaperonu<sup>91</sup>.

Základní úlohou molekulárních chaperonů je tedy chránit proteiny před nevhodnými interakcemi a udržovat meziprodukty sbalování na správné „cestě“, vedoucí k dosažení nativní konformace. Je také možné, že pomáhají udržovat protein v konformaci, vhodné pro snadný transport přes membrány. Možnost chybného sbalení je větší, jestliže rychlost biosyntézy je výrazně pomalejší, než proces sbalování. Protein v malém množství tedy vyžaduje pro správné sbalení přítomnost chaperonu.

Také některé další molekuly pomáhají správnému sbalování proteinů *in vivo* – například proteindisulfidomerasa, která katalyzuje tvorbu disulfidových vazeb v sekrečních proteinech a je hojnou součástí endoplazmatického retikula. Nebo další enzym: peptidyl-prolyl-*cis*-transisomerasa, katalyzující *cis-trans* izomeraci X-Pro peptidových vazeb. Tyto enzymy zrychlují sbalovací proces, který může za optimálních podmínek proběhnout i bez nich<sup>92,93</sup>. Některé enzymy podstupují po sbalení další chemické modifikace, jako je například glykosylace. Bylo prokázáno, že glykosylace nemění cestu sbalení (*in vitro* ani *in vivo*), ale pouze zvyšuje stabilitu proteinu, tato stabilizace je převážně entropického původu<sup>94</sup>.

## 10. Závěr

V předešlých kapitolách jsme se pokusili podat stručný a ucelený obraz problematiky sbalování proteinů jak je na něj nahlíženo v současnosti. Poněvadž díky pokrokům v instrumentační a výpočetní technice prochází toto odvětví bouřlivým vývojem, není možné s určitostí odhadnout, jakou cestou se řešení tohoto problému bude ubírat a jaké prostředky budou při objasňování tohoto jevu rozhodující.

Predikce nativní konformace proteinu o známé aminokyselino-ové sekvenci je jedna z velkých a otevřených otázek molekulární biologie a zároveň jedna z největších výzev pro novou vědu – bioinformatiku. Použitím rychlých výpočetních programů a superpočítačového času popsali Duan a Kollman<sup>95</sup> úspěšně sbalování přiměřeně velkého proteinového fragmentu pomocí simulace molekulovou dynamikou do stavu, který je blízký nativnímu. Proto se dá očekávat, že detailní počítačová simulace celého procesu sbalování, metodou molekulové dynamiky je možná.

Díky pokroku v sekvenaci (je znám kompletní genom třinácti bakterií a kvasinek, na dosah je zmapování genomu prvních vícebuněčných živočichů, jsou charakterizovány tři genomy rostlin, genom octomilky a kompletní sekvence lidského genomu je očekávána počátkem příštího tisíciletí) roste i tlak na vyřešení kódu struktury a funkce. Jednou z možných cest je homologické modelování, využívající všechny informace z databází známých struktur, jež jsou v současné době k dispozici. Bohužel efektivita i této metody je velmi nízká – asi 25 % pro proteiny s velmi blízkou aminokyselinovou sekvencí. Klesne-li homologie pod 25 %, spolehlivost metody klesá prudce k nule.

Mnoho malých proteinů se sbaluje spontánně za dobu několika sekund. Sekundární strukturní prvky, jako jsou šroubovice a  $\beta$ -struktury, vznikají řádově v dobách nanosekund až

mikrosekund. Jak bylo řečeno, sbalování je řízeno termodynamicky a je výsledkem fyzikálních interakcí mezi atomy proteinu a solventem. Tyto interakce jsou elementární a dobře popsané a tak se nabízí otázka, proč tyto znalosti nelze použít ke sledování celého procesu. Je tomu tak ze dvou základních důvodů. Tím prvním je, že počítače dnes používané, a to ani ty nejrychlejší a nejmodernější, nemohou procházet celý konformační prostor v rozumném čase. Druhým důvodem je, že si nemůžeme být jisti, zda dostupné empirické potenciály jsou dostatečně přesné k určení spolehlivé hodnoty volné energie vznikajícího proteinu. Příspěvky získané pomocí empirických potenciálů jsou jak kladné tak záporné a nabývají velkých hodnot, které se takřka ruší při určení celkové energie systému.

Přestože dosud nebyla popsána jediná úspěšná simulace celého procesu vytváření nativní struktury proteinu, je zřejmé, že zvláště díky posledním simulačním pokusům, přesvědčivě dokazujících jejich použitelnost, je molekulová dynamika znovu na scéně. Vylepšení výkonnosti počítačů zcela jistě ne malou měrou přispěje ke zlepšení současného stavu. Nemělo by se ovšem zapomínat, že k vyřešení je třeba detailně porozumět procesům na co nejvyšší teoretické úrovni – výpočty *ab initio* a náročné experimenty osvětluující všechny aspekty studovaného problému.

Někteří autoři přirovnávají hledání jednoho ze základních kódů přírody k hledání svatého grálu. Považujeme za vhodné zmínit na závěr jeden z citátů, který tuto legendu nejlépe vystihuje: *Grál na sebe může brát mnoho podob v průběhu doby a mnozí tvrdí, že již pochopili, ovládli a našli jeho tajemství. Můžeme snad spatřit jeho záblesk a tušit jeho obrysy, ale odhodlaní rytíři se musí připravit na dlouhé hledání a těžkou dráhu*<sup>96</sup>.

## LITERATURA

1. Anfinsen C. B., Haber E., Sela M., White F. H.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 47, 1309 (1961).
2. Anfinsen C. B.: Science 181, 223 (1973).
3. Anfinsen C. B., Scheraga H. A.: Adv. Prot. Chem. 29, 205 (1975).
4. Levinthal C. J.: Chem. Phys. 65, 44 (1968).
5. Wetlaufer D. B.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 697 (1973).
6. Wolynes P. G., Onuchic J. N., Thirumalai D.: Science 267, 1619 (1995).
7. Wetlaufer D. B.: Adv. Prot. Chem. 34, 61 (1981).
8. Jaenicke R.: Prog. Biophys. Mol. Biol. 49, 117 (1987).
9. Ghélics C., Yon J. M.: Protein Folding. Academic Press, New York 1982.
10. Jaenicke R.: Biochemistry 30, 3147 (1991).
11. Sharma A. K., Minke-Gogl V., Gohl P., Siebendritt R., Jaenicke R., Rudolph R.: Eur. J. Biochem. 194, 603 (1990).
12. Jecht M., Tomschy A., Kirschner K., Jaenicke R.: Protein Sci. 3, 411 (1994).
13. Herold M., Leister B., Hage A., Luger K., Kirschner K.: Biochemistry 30, 3612 (1991).
14. Williams K. P., Shoelson S. E.: Biochemistry 32, 11279 (1993).
15. Shoelson S. E., Sivaraja M., Williams K. P., Hu P., Schlesinger J., Weiss M. A.: EMBO J. 12, 795 (1993).
16. Ghélics C., Tempete-Gaillourdet M., Yon J. M.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 31 (1978).

17. Minard P., Hall L., Betton J. M., Missiakas D., Yon J. M.: *Protein Eng.* 3, 55 (1989).
18. Fairbrother W. J., Minard P., Hall L., Betton J. M., Missiakas D., Yon J. M.: *Protein Eng.* 3, 5 (1989).
19. Missiakas D., Betton J. M., Chaffotte A., Minard P., Yon J. M.: *Protein Sci.* 1, 1485 (1992).
20. Slaby I., Holmgren A.: *Biochemistry* 18, 5584 (1979).
21. Shiba K., Shimmel P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1880 (1992).
22. Ritco-Vonsovici M., Minard P., Desmadril M., Yon J. M.: *Biochemistry* 34, 16543 (1995).
23. Hudeček J., Kalous V.: *Fyzikálně chemická podmíněnost struktury bílkovin: metody popisu a predikce struktury*. Academia, Praha 1989.
24. Vita C., Fontana A.: *Biochemistry* 21, 5196 (1982).
25. Vita C., Fontana A., Jaenicke R.: *Eur. J. Biochem.* 183, 513 (1989).
26. Oas T. G., Kim P. S.: *Nature* 336, 42 (1988).
27. Taniuchi H., Anfinsen C.: *J. Biol. Chem.* 244, 3864 (1969).
28. Taniuchi H., Parker D. S., Bonhert J. L.: *J. Biol. Chem.* 252, 125 (1977).
29. Taniuchi H., Gary R. P., Juillerat M. A.: *Methods Enzymol.* 131, 185 (1986).
30. Wu L. C., Laub P. B., Elove G. A., Carey J., Roder H.: *Biochemistry* 32, 10271 (1993).
31. Harrison S. C., Durbin R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 4028 (1985).
32. Zimm B. H., Bragg J. K.: *J. Chem. Phys.* 31, 526 (1959).
33. Lifson S., Roig A.: *J. Chem. Phys.* 34, 1963 (1961).
34. Creighton T. E.: *Proteins: Structures, Molecular Properties*, 2 vyd. W. H. Freeman, New York 1992.
35. Schulz G. E.: *Angew. Chem. (Int. Ed. Engl.)* 16, 23 (1977).
36. Ptitsyn O. B.: *FEBS Lett.* 285, 176 (1991).
37. Brems D. N., Baldwin R. L.: *J. Mol. Biol.* 180, 1141 (1984).
38. Dill K.: *Biochemistry* 24, 1501 (1985).
39. Gregoret L. M., Cohen F. E.: *J. Mol. Biol.* 219, 109 (1991).
40. Dill K. A., Fiebig K. M., Chan H. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 1942 (1993).
41. Creighton T. E.: *Mechanisms of Protein Folding* (Pain R. H., ed.). Oxford University Press Inc., New York 1994.
42. Varley P., Gronenborn A. M., Christensen H., Wingfield P. T., Pain R. H., Clore G. M.: *Science* 260, 1110 (1993).
43. Bai Y., Milne J. S., Mayne L., Englander S. W.: *Proteins* 20, 4 (1994).
44. Radford S. E., Dobson C. M.: *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B.* 348, 17 (1995).
45. Ptitsyn O. B.: *J. Protein Chem.* 6, 273 (1987).
46. Ptitsyn O. B., Pain R. H., Semistonov G. V., Zerovnik E., Razgulyaev O. I.: *FEBS Lett.* 262, 20 (1990).
47. Ptitsyn O. B.: *Adv. Protein Chem.* 47, 83 (1995).
48. Kuwajima K.: *Proteins* 6, 87 (1989).
49. Roder H., Elove G. A., Englander S. W.: *Nature* 335, 700 (1988).
50. Sancho J., Fersht A. R.: *J. Mol. Biol.* 224, 741 (1992).
51. Matouschek A., Fersht A. R.: *Methods Enzymol.* 202, 82 (1991).
52. Garcia P., Desmadril M., Minard P., Yon J. M.: *Biochemistry* 34, 397 (1995).
53. Kim P. S., Baldwin R. L.: *Ann. Rev. Biochem.* 51, 459 (1982).
54. Kim P. S., Baldwin R. L.: *Ann. Rev. Biochem.* 59, 631 (1990).
55. Ohgushi M., Wada A.: *FEBS Lett.* 164, 21 (1983).
56. Goto Y., Fink A. L.: *Biochemistry* 28, 945 (1989).
57. Wong K. P., Hamlin L. M.: *Biochemistry* 13, 2678 (1974).
58. Beasty A. M., Matthews C. R.: *Biochemistry* 24, 3547 (1985).
59. Chaffotte A. F., Cadieux C., Guillou Y., Goldberg M. E.: *Biochemistry* 31, 4303 (1992).
60. Brems D. N., Plaisted S. M., Havel H. A., Kauffman E. W., Stodola J. D., Eaton L. C.: *Biochemistry* 24, 7662 (1985).
61. Kuwajima K.: *FASEB J.* 10, 102 (1996).
62. Bycroft M., Matouschek A., Kellis J. T. Jr., Serrano L., Fersht A. R.: *Nature* 346, 488 (1990).
63. Radford S. E., Dobson C. M., Evans P. A.: *Nature* 358, 302 (1992).
64. Shiraki K., Nishikawa K., Goto Y.: *J. Mol. Biol.* 245, 180 (1995).
65. Uversky V. N., Ptitsyn O. B.: *Biochemistry* 33, 2782 (1994).
66. Jeng M. F., Englander S. W.: *J. Mol. Biol.* 221, 215 (1991).
67. Creighton T. E.: *TIBS* 22, 6 (1997).
68. Fink A. L., Oberg K. A., Seshadri S.: *Fold. Des.* 3, 19 (1997).
69. Dill K. A.: *Biochemistry* 24, 1501 (1985).
70. Dill K. A., Fiebig K. M., Chan H. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 1942 (1993).
71. Garvey E. P., Swank J., Matthews C. R.: *Proteins Struct. Funct. Genet.* 6, 259 (1989).
72. Yon J. M.: *Cell. Mol. Life Sci.* 53, 557 (1997).
73. Neri D., Billeter M., Wider G., Wuthrich K.: *Science* 257, 1559 (1992).
74. Logan T. M., Theriault Y., Fesik S. W.: *J. Mol. Biol.* 236, 637 (1994).
75. Plaxco K. W., Dobson C. M.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 630 (1996).
76. Pecorari F., Guilbert C., Minard P., Desmadril M., Yon J. M.: *Biochemistry* 35, 3465 (1996).
77. Pecorari F., Minard P., Desmadril M., Yon J. M.: *J. Biol. Chem.* 271, 5270 (1996).
78. Kuwajima K., Mitani M., Sugai S.: *J. Mol. Biol.* 206, 547 (1989).
79. Blond-Elguindi S., Goldberg M. E.: *Biochemistry* 29, 2409 (1990).
80. Matouschek A., Kellis J. T., Serrano L., Bycroft M., Fersht A. R.: *Nature* 346, 440 (1990).
81. Lecomte J. T. J., Matthews C. R.: *Protein Eng.* 6, 1 (1993).
82. Levitt M., Clothia C.: *Nature* 261, 552 (1976).
83. Brandts J. F., Halvorson H. R., Brennan M.: *Biochemistry* 14, 4953 (1976).
84. Daggett V., Levitt M.: *J. Mol. Biol.* 232, 600 (1993).
85. Levitt M.: *J. Molec. Biol.* 145, 251 (1981).
86. Ellis R. J.: *Ann. Rev. Biochem.* 60, 321 (1991).
87. Hartl F. U.: *Nature* 381, 571 (1996).
88. Ellis R. J., Hartl F. U.: *FASEB J.* 10, 20 (1996).
89. Hayer-Hartl M. K., Weber F., Hartl F. U.: *EMBO J.* 15, 6111 (1996).
90. Milla M. E., Sauer R. T.: *Biochemistry* 33, 1125 (1994).
91. Schmid F. X.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1, 36 (1990).

92. Lorimer G. H.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, 26 (1992).
93. Wang C., Eufemi M., Turano C., Giartosie A.: *Biochemistry* 35, 7299 (1996).
94. DeCoster G. T., Robertson A. D.: *Biochemistry* 36, 2323 (1997).
95. Duan Y., Kollman P. A.: *Science* 282, 740 (1998).
96. Berendsen H. J. C.: *Science* 282, 642 (1998).

**M. Švec and J. Vondrášek** (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Protein Folding: State of the Problem at the End of Millenium**

To be biologically active, proteins must adopt specific folded three-dimensional tertiary structures. Yet the genetic information for the proteins specifies only the primary struc-

ture, the linear sequence of amino acids in the polypeptide backbone. Many purified proteins can spontaneously refold in vitro after being completely unfolded, so the three-dimensional structure must be determined by the primary structure. How this occurs has become known as the protein-folding problem. It was primarily of academic interest, but the advent of protein engineering and the ability to produce any protein, often in an insoluble, unfolded, inactive and useless form, has made it also of great practical importance. The problem can be divided into two main questions. The first is by what kinetic process or pathway does protein adopt its native and biologically active folded conformation and the other, what is the physical basis of the stability of folded conformations. The present review summarizes the present state of knowledge of the problem and attempts to put it into perspective for what could follow.