

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ СТРУКТУРЫ ТРАНСГЕННЫХ БЕЛКОВ И ОБУСЛОВЛЕННЫЕ ИМИ ФАКТОРЫ РИСКА



С. В. ВЕРЕВКА

Институт отоларингологии им. А.С. Коломийченко АМН Украины, Киев
Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев

E-mail: verevka@biochem.kiev.ua

Рассмотрены проблемы, обусловленные развитием технологии трансгенных продуктов питания. В свете данных о молекулярных механизмах формирования структуры белков и обеспечении межбелковой комплементарности обосновывается положение о комплексном характере функционирования структурообразующих, поддерживающих и элиминирующих систем. Обсуждаются пути нарушения трансгенными продуктами межбелкового согласования и его возможные последствия.

Ключевые слова: трансгенные белки, факторы риска, шапероны, мисфолдинг, прионы.

Трансгенные технологии составляют одно из наиболее спорных достижений современной науки, вызывая неослабевающую полемику вокруг создаваемых ими возможностей и порождаемых проблем. Поднимаемые вопросы и предположения охватывают редкий по широте диапазон от хорошо оплаченного оптимизма до ограничений, налагаемых религиозными догмами. Немалую роль играет и традиционное «как бы чего не вышло», не способствующее, но и не препятствующее все более широкому внедрению продуктов с непредсказуемым побочным действием. Не пора ли отказаться от обывательской точки зрения и попытаться оценить существующую проблему на основании имеющихся данных о молекулярных механизмах формирования белковых структур и путях обеспечения межбелковой комплементарности, лежащих в основе регуляции неисчислимого множества биологических процессов? Подобный подход позволит хотя бы в какой-то степени оценить остроту создаваемых трансгенными технологиями проблем, осознать факторы риска и разработать меры для их предупреждения.

Механизмы формирования структурной организации белковых молекул

В основе функциональной активности белковых молекул лежит их способность участвовать в строго определенных для каждого белка межмолекулярных взаимодействиях [1, 2]. Подобная специализация обеспечивается формированием для каждой из белковых молекул нативной, единственно верной только для нее и только для каждого отдельного этапа процессинга молекулы, конформации. При этом каждая из белковых молекул представляет собой сложный молекулярный объект, находящийся в состоянии динамического равновесия между в той или иной степени стабилизированными изоформами [3]. Степень термодинамической стабилизации различных белков колеблется в широких пределах: одни сохраняют свою структуру при жестких химико-физических воздействиях, другие — в той или иной мере способны к обратимой денатурации, третьи — лабильны и постоянно пребывают в неупорядоченном состоянии. Белковым молекулам присуща многоуровневость структуры. Первичная структура белка — его аминокислотная последовательность — задается генетически и остается неизменной на протяжении

жизни данного организма. Регулярность структуры полипептидной цепи совместно со сложным комплексом внутримолекулярных взаимодействий обеспечивают формирование элементов вторичной структуры — α -спиралей, β -складчатых структур, нескольких видов конформационных изгибов и неупорядоченных участков. В контексте данной работы целесообразно подчеркнуть две особенности β -складчатых структур. Во-первых, заслуживает упоминания способность их к формированию антипараллельных укладок — стабилизированных многочисленными межцепочечными взаимодействиями регулярных структур, состоящих из двух и более взаимно противоположных участков полипептидной цепи. Из-за сложного комплекса межцепочечных взаимодействий поверхность подобных блоков отличается повышенной гидрофобностью. Крайний случай подобного структурирования представлен β -бочоночными структурами, сформированными блоком β -укладок и характерными для конститутивных белков клеточных мембран [4, 5]. Вторая особенность состоит в способности β -структурированных матриц вызывать лавинообразное агрегирование многих нативных белков с последовательной трансформацией их структуры по β -складчатому типу [6]. Формирование следующего — третичного — уровня белковой структуры представляет собой исключительно сложный и все еще не поддающийся компьютерному моделированию процесс, опосредованный взаимодействием элементов вторичной структуры не только между собой, но и с многочисленными белковыми компонентами клетки. Распространенная в свое время гипотеза о самосборке белковых молекул в сторону минимализации свободной энергии оказалась несостоятельной для большинства сколько-нибудь сложных белков, но, к сожалению, все еще составляет неотъемлемую атрибутику некоторых учебников биологической химии в качестве единственно возможного пути формирования структуры белков [7]. Гипотеза основывалась на ставших классическими экспериментах К. Б. Анфинсена по окислительной ренатурации полностью восстановленной и денатурированной рибонуклеазы [8]. Однако оставались без объяснения причины необратимой денатурации белков, равно как и безуспешность многочисленных попыток ренатурации последних [9]. Обнаружение ренатурирующего влияния клеточного цитозоля на не поддающиеся ренатурации традиционными методами денатурированные белки привело к откры-

тию молекулярных шаперонов — разнообразного и многофункционального класса белков, обеспечивающих формирование и поддержание нативного конформационного состояния других белков. Согласно общепринятому определению, молекулярные шапероны составляют класс белков, assisting процесс правильной нековалентной укладки полипептидов или полипептидсодержащих структур в условиях *in vivo*, но не являющихся компонентами образующихся структур [10]. То есть отнесение к шаперонам определяется функциями белка и не связано с его структурой. Обладая схожей функцией, шапероновые белки могут быть подразделены на две большие группы. К первой из них относятся мономерные шапероны с молекулярной массой порядка 70–100 кДа, вторую группу составляют олигомерные шапероны, называемые шаперонинами, с молекулярной массой около 800 кДа [11]. Каждая из этих групп подразделяется на несколько отличающихся друг от друга семейств, находящихся между собой в сложных функциональных взаимодействиях. Действие шапероновых белков состоит в своего рода ассистировании самоукладки формируемого белка в правильную, обладающую биологической активностью форму, что сопряжено с формированием локальных энергетических минимумов и является энергоемким, АТФ-зависимым процессом [11]. Не менее важная функция шапероновых белков состоит в поддержании белков в нативном состоянии. Резкое возрастание количества шаперонов под влиянием стрессовых факторов обусловило их распространенное определение как белков теплового шока [12, 13]. Это не совсем правильно, поскольку шапероны — многофункциональные белки, задействованные не только в формировании и поддержании белковой структуры, но и в транспортировке белков от эндоплазматического ретикулума к субклеточным частицам, переносе белков сквозь клеточные мембраны и многом другом [11, 14]. На примере недостаточных по шаперонам мутантов показано, что белки, не прошедшие опосредованную шаперонами укладку, проявляют тенденцию к формированию агрегатов [15]. Не подлежит сомнению, что гарантированное формирование нативной структуры белка может быть обеспечено только при его биосинтезе в родной клеточной системе, поскольку продуцируемые трансгенными клетками рекомбинантные белки подвержены сильнейшей агрегации, ведущей к формированию так называемых телец включения [16, 17].

Структурные основы межбелковой комплементарности

Закономерно возникают вопросы, связанные с молекулярными механизмами формирования и распознавания белковых молекул. Каким образом шапероновые белки распознают подлежащие формированию или исправлению белковые молекулы на фоне характерного для живого организма множества других белков? Что обеспечивает правильность укладки каждого отдельного белка при огромном разнообразии возможных вариантов? Из-за очевидной невозможности обеспечения каждого белка персональной шапероновой системой рассматриваемая сторона вопроса становится как бы неразрешимой. С другой стороны, как распознаются подлежащие элиминации выполнившие свои биологические функции или денатурированные белки? Каким образом немногочисленные в общем убиквитин-лигазы E3 протеасомного комплекса [18] дифференцируют подлежащие маркировке молекулы на фоне невообразимого набора конформационных состояний множества белков данной клеточной системы? Схожие вопросы могут быть заданы и в отношении молекулярных механизмов функционирования иммунной системы. Например, каким образом обеспечивается дифференцирование множества собственных белков в нативной конформации от денатурированных или чужеродных? Систематизация данных о структурном обеспечении взаимной комплементарности белковых молекул позволяет в какой-то мере приблизиться к ответу на эти вопросы. Особого внимания при этом заслуживают данные об участках непосредственного межмолекулярного контакта белковых молекул, функционально формирующих межмолекулярный комплекс. Сравнение данных о величине поверхностей, маскируемых при образовании межбелковых комплексов, свидетельствует о высоком уровне групповой дискретности. Наблюдаются две группы размерности — «стандартная» (порядка $1600 \pm 400 \text{ \AA}^2$) и «большая» (около $3500 \pm 200 \text{ \AA}^2$) [19, 20]. Подобное распределение едва ли случайно и, по-видимому, свидетельствует о существовании термодинамически необходимого и достаточного минимума, обеспечивающего эффективное взаимное связывание функционально комплементарных белков [19, 21]. Основу «стандартной» группы формируют комплексы протеиназа–ингибитор и антиген–антитело. По скорости формирования эти комплексы относятся к наиболее

быстрым процессам межбелковой ассоциации, т. е. они соответствуют необходимым и достаточным условиям быстрого распознавания и взаимного связывания комплементарных белков. Поверхности непосредственного межбелкового контакта принято делить на связывающие участки и связываемые детерминанты (лигандные группы, эпитопы и т.п.). Для случая взаимодействий белковый ингибитор — протеиназа и антиген — антитело размерности связываемых детерминант практически одинаковы и примерно составляют $600\text{--}800 \text{ \AA}^2$, что соответствует группе из 2–3 компактно расположенных аминокислотных остатков [19, 20]. Наиболее подробно изучено комплексообразование белковых ингибиторов сериновых протеиназ с соответствующими ферментами. Показано, что шесть остатков (P3–P3 согласно номенклатуре Шехтера–Бергера) [22] реактивного центра ингибитора занимают до 77% поверхности ингибитора, маскируемой при комплексообразовании, причем на долю остатков в положениях P1 и P2' приходится повышенная степень маскируемости и аномально высокое число контактов с аминокислотными остатками фермента [23, 24]. Эти остатки адекватны по лигандной специфичности связывающему (S1-) и эффекторному (S2'-) участкам фермента и расположены в оптимальной, так называемой канонической, конформации [25]. Синхронное взаимодействие связывающего и эффекторного подучастков активного центра фермента с расположенными в надлежащей конформации аминокислотными остатками ингибитора составляет необходимое и достаточное условие высокоизбирательного и эффективного комплексообразования [26].

Сходным образом обеспечивается распознавание протеиназами участков активационного расщепления белковых проформ, равно как и ряд других случаев взаимодействия функционально комплементарных белков [27]. Оно может быть определено как мотив 1-X-3 межбелкового распознавания, при котором два функционально важных остатка разделены третьим, несущественным [28]. Во всех рассмотренных случаях связывающий компонент «видит» не всю связываемую молекулу, а лишь экспонированную на поверхности пару аминокислотных остатков мотива 1-X-3, своего рода поверхностный микрокластер, обеспечивающий распознавание и связывание белка-мишени комплементарным белком. Способность подобной группы к эффективному комплексо-

разованию определяется как природой соответствующих аминокислотных остатков, так и соответствием их конформационного расположения структурным требованиям белка-партнера. При несоответствии этим требованиям сколько-нибудь эффективное взаимодействие исключено, чем, в частности, может быть объяснено явление вторичной специфичности белковых ингибиторов протеиназ — зависимости способности белка блокировать ферменты одного и того же типа от источника получения последних [25, 29]. Степень конформационной подвижности составляющих связываемую группу остатков также оказывает значительное влияние на степень ее функциональной реализации. Искусственное нарушение «канонической» для данного фермента конформации лишает связываемый белок способности к эффективному комплексобразованию, что неоднократно наблюдалось при самых разнообразных воздействиях на конформацию реактивных центров белковых ингибиторов сериновых протеиназ [28]. Вместе с тем формирование на поверхности белковой молекулы стабилизированной группы — аналога эффективно связываемого микрокластера — обеспечивает ее участие в соответствующих взаимодействиях. В частности, для большинства ингибиторов сериновых протеиназ растительного происхождения отсутствует четкое объяснение их функциональной роли как ингибиторов [30]. С одной стороны, ингибируемые ферменты никоим образом не находятся в функциональной связи с этими белками [31], а с другой — известно множество высокомолекулярных белков из родственных источников, лишенных ингибиторных свойств [32]. Поэтому для белковых ингибиторов растительного происхождения допустимо предположение о случайном характере формирования в жестко структурированных резервных белках поверхностных групп — структурных аналогов реактивных центров белковых ингибиторов функционально чужеродных ферментов.

Не меньшего внимания заслуживают структурные особенности связываемых детерминант, обеспечивающих формирование комплексов антиген — антитело. Размерность маскируемых в ходе комплексобразования поверхностей практически одинакова со случаем взаимодействия протеиназа — белковый ингибитор [19, 20], причем структурное моделирование как тех, так и других связываемых фрагментов не сопровождается какими-либо методическими затруднениями [33, 34]. Иммуногенность или неимму-

ногенность белка определяется наличием на его поверхности микрокластера, состоящего из нескольких компактно расположенных аминокислот и обеспечивающего быстрое и высокоизбирательное связывание антителом. Для относящегося к данной биологической системе нативного белка наличие подобной «черной метки» исключается его нативной конформацией, на поверхности же чужеродного или денатурированного белка ее присутствие возможно, более того — обеспечено статистически. Вероятно, именно поэтому иммуноглобулины, будучи инертными по отношению к белкам в нативной конформации, эффективно связывают денатурированные и чужеродные. Степень конформационной стабилизации связываемой группировки также играет важную роль: как известно, увеличение иммуногенности пептидных эпитопов посредством ковалентной конъюгации относится к классическим методам молекулярной иммунологии.

В отличие от протеиназ, связывающие свойства иммуноглобулинов подвержены существенным изменениям. Так, модификация нативных иммуноглобулинов хаотропными агентами приводит к «размыванию» лигандной специфичности иммуноглобулина и проявлению аффинности по отношению к самым разнообразным антигенам. Предполагается, что подобные изменения обусловлены подвижностью субдоменных структур активных центров иммуноглобулинов, функционально необходимой для подстройки под структуру различных антигенов. Средство полиреактивных иммуноглобулинов к иммобилизованным на нерастворимой поверхности белкам возрастает при денатурации последних, введение же в систему низкомолекулярных лигандов с двумя-тремя подвижными гидрофобными группировками, расположенными на расстояниях, обеспечивающих перекрывание площади, характерной для взаимодействий антиген-антитело, приводит к существенному увеличению связывающих свойств как нативных, так и модифицированных хаотропными агентами иммуноглобулинов [35]. Отмеченный эффект может рассматриваться как результирующее проявление двух процессов: индукции эффектором структурирования иммуноглобулинов в высокоэффективную конформацию и конкуренции за сформированный сильносвязывающий участок иммуноглобулина между растворенными молекулами низкомолекулярного эффектора и статистически сформированными на поверхности иммобилизованного белка

лигандными группами. Иными словами, иммуноглобулинам присуща пластичная специфичность — способность подстраиваться под те или иные «чужие» поверхностные группы. Предполагается, что она обусловлена подвижностью субдоменных структур активных центров иммуноглобулинов и функционально необходима для подстройки под структуру различных антигенов [36, 37]. С другой стороны, подобная пластичная специфичность создает возможность переноса сформированного иммунного ответа на «свои» группы.

Таким образом, структурное обеспечение межбелковой комплементарности может быть сведено к классическому разделению формирующих поверхность белка малых структурных групп на «свои» и «чужие», причем «чужими» оказываются все, не относящиеся к «своим». Для простейшего случая мотива 1-X-3 любой поверхностный фрагмент полипептидной цепи (...ABCDEFGH...) может рассматриваться как набор состоящих из трех аминокислотных остатков микрокластеров. При этом каждый из доступных для межбелкового контакта аминокислотных остатков оказывается составной частью двух групп (АХС, СХЕ, ЕХG, GXI) — в третьем и первом положениях, соответственно. Подобным образом, в частности, обеспечивается распознавание и расщепление протеиназами приманочного участка α_2 -макроглобулина. В зависимости от субстратной специфичности фермента фрагмент ...-Arg*-Leu-Val*-His-Val-... расщепляется либо по отмеченному аргинину, либо по валину [38, 39]. Этот фрагмент может рассматриваться как пара поверхностных групп -Arg-Leu-Val- и -Val-His-Val-. Тем самым поверхность любой белковой молекулы можно рассматривать как набор в той или иной мере стабилизированных микрокластеров, более или менее соответствующих или не соответствующих определенным для данной биологической системы структурным правилам. Степень визуализации каждого из микрокластеров определяется природой составляющих аминокислотных остатков, их конформационным расположением и степенью стабилизации последнего.

Приведенные положения в полной мере относятся к функционированию структурообразующих и поддерживающих систем. Формирование «правильной» конформации для каждого из множества синтезируемых белков сводится к исключению на поверхности формируемой молекулы групп, конформационно отличных от сравнительно не-

большого набора разрешенных. Подобного рода поверхностная «рихтовка» сопряжена с формированием локальных энергетических минимумов и не может не быть энергозатратной, АТФ-зависимой, что и наблюдается в действительности [11]. Показательно, что правильный фолдинг обеспечивается лишь для нативных белков данной клетки, формирование же полноценных структур рекомбинантных белков остается сложной и далекой от разрешения проблемой молекулярной биологии [16,17,40]. Сходным образом шапероновые белки различают нативные и денатурированные формы «родных» белковых молекул, оставаясь нейтральными к первым и энергично взаимодействуя со вторыми [41].

Аналогичным образом может быть объяснена способность к выявлению чужих или своих, но денатурированных белковых молекул компонентами иммунной системы, равно как и способность убиквитин-лигаз E3 протеасомного комплекса распознавать подлежащие маркировке молекулы на фоне огромного пула других белков. Наличие неправильного для данной клеточной системы поверхностного микрокластера оказывается достаточным для распознавания белка на фоне множества других, не имеющих подобного рода «черной метки». Естественным следствием такого распознавания является как включение полиубиквитинилированных компонентов в характерные для амилоидных заболеваний центральной нервной системы белковые агрегаты, так и ингибирование протеасомного комплекса филаментами и олигомерами соответствующих белков [42–44].

Тем самым структурное обеспечение процессинга белков сводится к формированию и распознаванию «своих» и «чужих» поверхностных микрокластеров, причем природа составляющих микрокластер аминокислот, их конформационное расположение и степень стабилизации последнего оказываются решающими факторами молекулярного дифференцирования. Подобная разбивка существенно упрощается функциональным подобием аминокислот в пределах одной группы (гидрофобных, полярных незаряженных, положительно или отрицательно заряженных). Для каждой конкретной клеточной системы структурирование белков ограничено разрешенными «своими» комбинациями, «чужими» же оказываются все, не соответствующие исключительным правилам, установленным для «своих».

Отмеченные положения имеют два исключительно важных функциональных следствия. С одной стороны, согласованность структурных правил распознавания молекулярных систем формирования, поддержания и элиминации белков оказывается неременным условием жизнеспособности организма в целом, обеспечивающим нормальный процессинг сколь угодно большого числа белков и позволяющим говорить о своего рода комплексной системе межбелкового согласования. С другой стороны, нарушение нормального функционирования хотя бы одного из компонентов подобной системы неизбежно сказывается на функционировании остальных. Появление сколько-нибудь значительного количества белковых молекул с «чужими» поверхностными группами неизбежно скажется на функционировании структурообразующих и элиминационных систем. Учет этих положений необходим для понимания проблем, создаваемых биотехнологией трансгенных белков.

Мембранный фолдинг и возможности нарушения межбелковой координации трансгенными белками

Возникновение и стремительное развитие трансгенных технологий также сопряжено с рядом проблем, обусловленных нарушением нативного фолдинга белка. Неспособность фолдинговой системы клеток-продуцентов обеспечить формирование нативной конформации трансгенного белка ведет к образованию телец включения — агрегатов, весьма подобных формируемым при амилоидных заболеваниях центральной нервной системы. Применение методов технологического рефолдинга позволяет в той или иной степени реактивировать получаемый продукт [16, 17], однако вопрос об его иммуногенности остается открытым [45]. Иммуногенность белковых препаратов, то ли обретенная вследствие самоповреждения нативных белков [46, 47], то ли из-за особенностей формирования структуры рекомбинантных белков, не только снижает эффективность соответствующего препарата и обуславливает необходимость увеличения лекарственной дозы, но и чревата развитием аутоиммунной реакции на нативные белки [45–47]. При этом в силу случайного подобию поверхностных эпитопов под прессом аутоиммунной реакции может оказаться не только белок, соответствующий вводимому препарату, но и белки, не имеющие с последним никакой функциональной связи.

И если побочные эффекты применения очищенных рекомбинантных белков медикаментозного назначения могут быть хоть как-то учтены, то последствия массового и практически неконтролируемого употребления трансгенных продуктов питания не поддаются даже приблизительной оценке. И дело даже не в несоизмеримо больших пищевых количествах поступающего в организм белка. В отличие от проходящих сложную систему очистки рекомбинантных белков медикаментозного предназначения, трансгенные продукты питания представляют собой невообразимую композицию биологических компонентов, включающую белки, сформированные в чужеродной клеточной системе. И если присутствие в пищевых продуктах практически нерастворимых белковых агрегатов влечет за собой лишь увеличение нагрузки на соответствующие компоненты пищеварительной системы, то белки, инкорпорированные в клеточные мембраны, создают намного более серьезные проблемы, обусловленные особенностями формирования их структур в чужеродной клеточной системе. Каковы же альтернативы нативному фолдингу, какие факторы влияют на формирование структуры рекомбинантного белка? Понятно, что альтернативное нативному фолдингу структурообразование белка в условиях реальной клетки весьма далеко от классической анфинсеновской самосборки, поскольку проходит в концентрированном (порядка 340 г/л) макромолекулярном окружении [15]. Однако еще более существенным фактором представляется структурообразующая роль фосфолипидного бислоя клеточных мембран. Исследование взаимодействий неструктурированных полипептидных цепей и белков с нативными и модельными мембранами позволило выявить ряд закономерностей, позволяющих говорить об опосредованном мембранными структурами фолдинге как о регулярном процессе, протекающем по своим, существенно отличным как от самосборки в сторону минимализации энергии, так и от шаперонопосредованной укладки, правилам [48–50]. Отмечается многостадийность процесса, охватывающего первичное связывание неструктурированной полипептидной цепи с поверхностью мембраны, ее свертывание, инкорпорацию внутрь гидрофобного бислоя и формирование элементов вторичной структуры [51]. Последующий переход на третичный уровень структуры также обусловлен комплексом взаимодействий между отдельными участками полипептидной цепи и гидрофоб-

ной составляющей фосфолипидного бислоя. Наряду с этим конститутивным белкам клеточных мембран присущи структурные особенности — повышенное содержание α -спиралей и β -укладок, взаимная компенсированность поверхностных заряженных групп и повышенная концентрация положительно заряженных остатков на внутриклеточной части молекулы. По уровню гидрофобности поверхности подвергшихся мембранному фолдингу структур соизмеримы с конститутивными белками клеточных мембран и существенно превосходят прошедшие нативный фолдинг растворимые белки [52–54]. Повышенная гидрофобность поверхности подобных белков обеспечивает способность инкорпорироваться или пройти сквозь клеточные мембраны, в гидрофильной же среде они подвержены агрегации. Взаимная компенсированность поверхностных заряженных групп существенно стабилизирует сформированную глобулу, что, с одной стороны, обеспечивает повышенную устойчивость молекулы к протеолизу, а с другой — может вызывать необратимое и прогрессирующее нарушение функционирования системы фолдинга новосинтезируемого белка. Вместе с тем присутствие в клеточной системе белков, не поддающихся нативному структурированию, не может не сказаться на функционировании последней, что, в свою очередь, не может не отразиться на функциональной активности множества «своих» белков и жизнеспособности клетки в целом. Повидимому, именно этим обстоятельством объясняется сомнительная репродуктивная состоятельность генетически модифицированных растений. При этом практически несущественно, является ли белок растворенным или агрегированным, рекомбинантным или подвергшимся мисфолдингу нативным. В любом случае формирование поверхностной структуры молекулы по правилам, существенно отличным от установленных в данной биологической системе, статистически обеспечивает присутствие как поверхностных микрокластеров, распознаваемых как «чужие», так и групп — структурных аналогов участков межмолекулярных взаимодействий, ничего общего с нормальным процессингом данного белка не имеющих. Иными словами, мембранный фолдинг способен наделять белковую молекулу комплексом свойств, обеспечивающих возникновение серьезных молекулярных дисфункций. Пожалуй, в наиболее яркой форме подобного рода патогенный мисфолдинг представлен в случае трансмиссивных спонгиформных энцефалопатий.

Трансмиссивные спонгиформные энцефалопатии составляют группу необратимо прогрессирующих и летальных заболеваний центральной нервной системы, отличающихся уникальной природой лишённого нуклеиновых компонентов белкового инфицирующего агента — так называемой патогенной формы прионов (PrP^{Sc}), в генетическом и химическом отношении идентичного интенсивно нарабатываемому нервными клетками млекопитающих белка (PrP^{C}). Единственное отличие между нормальной и патогенной изоформами состоит в способе укладки полипептидной цепи: если в первой доминирует α -спирализация и лишь 3% цепи имеет β -укладку, то во второй доля последней достигает 43% [55]. Конформационные различия белковых форм определяют отличия по целому ряду свойств. Прионовое инфицирование вызывает серьезные повреждения шапероновой системы нервных клеток [56–58]. Окончательное формирование протеиназостойчивой патогенной конформации прионового белка происходит в наружной мембране нервных клеток [59]. Следовательно, патогенная изоформа прионового белка может рассматриваться как типичный продукт мембранного фолдинга [60]. Ее структурные свойства в полной мере соответствуют свойствам, характерным для белковых структур, прошедших мембранный фолдинг. Это и возросшая доля β -укладки [55], и повышенная гидрофобность поверхности, обеспечивающая способность к прохождению сквозь клеточные мембраны [59, 61] и формированию амилоидных ассоциатов [62, 63]. Высокая стабильность молекулы и ее протеиназостойчивость также могут быть отнесены к следствиям мембранного фолдинга, обеспечивающего компенсированность заряженных аминокислотных остатков на поверхности белка. В силу тех же причин на поверхности PrP^{Sc} сформированы дипольные пары, эффективно связываемые лизинсвязывающими участками плазминогена [64], что наряду со способностью к прохождению сквозь клеточные мембраны создает возможность переноса внеклеточных протеиназ во внутриклеточное пространство. С другой стороны, при определенных условиях способность подобных белков инкорпорироваться в фосфолипидные мембраны может привести к физиологически необоснованному поверхностному накоплению и активации соответствующих ферментов.

Вероятно, трансмиссивные спонгиформные энцефалопатии представляют собой

крайний случай формирования негативной обратной связи самоподдерживающегося и необратимо прогрессирующего мисфолдинга. Однако ряд свойств, обретаемых патогенной изоформой прионового белка вследствие мембранного фолдинга, вызывают серьезные опасения в отношении прошедших структурирование в чужеродной клеточной системе трансгенных белков. Устойчивость подобного рода структур к денатурационным воздействиям и протеолизу в полной мере проявилась во время недавней эпизоотии крупного рогатого скота в Великобритании и ряде европейских стран. Упрощение технологии обработки белковых добавок к комбикормам, в частности отказ от ставшего нерентабельным экстрагирования жиров и жесткого автоклавирования, обусловило сохранение инфицирующего действия находившейся в сырьевых субпродуктах патогенной изоформы прионового белка.

Вследствие высокой конформационной устойчивости и устойчивости к протеолизу, способности к инкорпорации и прохождению сквозь клеточные мембраны, статистически сформированным на поверхности участкам высокоизбирательного взаимодействия с функционально чужеродными белками подобные структуры оказываются едва ли не идеально приспособленными для нарушения функционирования всего комплекса систем межбелкового согласования как в клетке-производителе, так и в организме потребителя подобного рода продукции. Инициация аутоиммунных заболеваний белками продуктов питания известна давно [65–67], однако в случае трансгенных продуктов питания риск несоизмеримо выше, поскольку в силу чужеродности трансгенных белков шапероновой системе клетки-производителя какая-то их часть может быть сформирована по правилам мембранного фолдинга со статистически гарантированным наделением белка комплексом рассмотренных свойств. Еще одним, весьма настораживающим, обстоятельством представляется возможность формирования на поверхности подвергшихся мембранному фолдингу белков дипольных пар, эффективно связываемых лизинсвязывающими участками плазминогена [64]. Присутствие подобного рода групп на поверхности подвергшихся мембранному фолдингу белков совместно с высокой конформационной стабильностью и способностью к инкорпорации в мембранные структуры способны обеспечить трансмембранный перенос соответствующих ферментов с последующим нарушением важнейшего принципа функционирования

биологических систем — компарментализации биохимических процессов [68]. С другой стороны, задействованность лизинсвязывающих участков, комплементарных им групп и соответствующих ферментов и факторов в процессах пролиферации и метастазирования [69–71] побуждает поднять вопрос о потенциальной онкогенности подвергшихся мембранному фолдингу белков.

Из-за значительных различий физико-химических свойств очистка белков медикаментозного назначения от возможной примеси подвергшейся мембранному фолдингу изоформы представляет собой вполне решаемую задачу. В случае же белков трансгенных продуктов питания статистически обеспеченное присутствие соответствующих эпитопов на поверхности подобных стабильных и легко проходящих сквозь клеточные мембраны изоформ обуславливает нарушение межмолекулярного согласования структурообразующих, поддерживающих и элиминирующих белковых систем с последующим развитием заболеваний самого широкого профиля. При этом, в отличие от упомянутой эпизоотии крупного рогатого скота или обусловленного ритуальным каннибализмом аборигенов Новой Гвинеи заболевания куру, сама возможность отслеживания причинно-следственных связей между потреблением трансгенных продуктов питания и необъяснимым возрастанием уровня самых разнообразных заболеваний крайне затруднена — не столько вследствие методических трудностей проведения соответствующих исследований, сколько по много более прозаическим причинам экономического характера. Изложенные соображения позволяют сделать вывод о потенциальном риске, сопряженном с продукцией трансгенных технологий, необходимости соответствующей его оценки и недопустимости коммерческой профанации этого интереснейшего направления современной биохимии и молекулярной биологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Van Regenmontel M. H. V.* A paradigm shift is needed in proteomics: 'structure determines function' should be replaced by 'binding determines function' // *J.Mol.Recognit.* — 2002. — V. 15, N 6. — P. 349–351.
2. *Edelman G.* Biochemistry and the sciences of recognition // *J.Biol.Chem.* — 2004. — V. 279, N 9. — P. 7361–7369.
3. *Демченко А.П.* Люминесценция и динамика структуры белков. К.: Наук. думка, 1988. — 280 с.

4. *Valavanis I. K., Bados P. G., Emiris I. Z.* Beta-barrel transmembrane proteins: geometric modelling, detection of transmembrane region, and structural properties // *Comput. Biol. Chem.* — 2006. — V. 30, N 6. — P. 416–424.
5. *Galdiero S., Galdiero M., Pedone C.* Beta-barrel membrane bacterial proteins: structure, function, assembly and interaction with lipids // *Curr. Prot. Pept. Sci.* — 2007. — V. 8, N1. — P. 63–82.
6. *Koga T., Taguchi K., Kogiso M. et al.* Amyloid formation of native folded protein induced by peptide-based graft copolymer // *FEBS Lett.* — 2002. — V. 531, N2. — P. 137–140.
7. *Губський Ю. І.* Біологічна хімія: Підручник. — Київ-Тернопіль: Укрмедкнига, 2000. — 508 с.
8. *Anfinsen C. B.* Principles that govern the folding of protein chains // *Science.* — 1973. — V. 181, N4096. — P.223–230.
9. *Белицер В. А.* Макроструктура и денатурационные превращения белков // *Укр. биохим. журн.* — 1962. — Т. 34, №2. — С. 290–320.
10. *Ellis J.* The general concept of molecular chaperones // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* — 1993. — V. 339, N1289. — P. 257–261.
11. *Евстигнеева З. Г., Соловьева Н. А., Сидельникова Л. И.* Структура и функции шаперонов и шаперонинов // *Прикл. биохим. и микробиол.* — 2001. — Т. 37, №1. — С. 5–18.
12. *Derham B. K., Harding J. J.* α -Crystallin as a molecular chaperone // *Prog. in Retin. Eye Res.* — 1999. — V. 18, N4. — P. 463–509.
13. *Ellis J.* Proteins as molecular chaperones // *Nature.* — 1987. — V. 328, N 6129. — P. 378–379.
14. *Srivastava P.* Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity // *Nature Reviews (Immunology).* — 2002. — V. 2. — P. 185–194.
15. *Hartl F. U.* Molecular chaperones in cellular protein folding // *Nature.* — 1996. — V. 381, N 6583. — P. 571–579.
16. *Маркосян К. А., Курганов Б. И.* Фолдинг, неправильный фолдинг и агрегация белков. Образование телец включения и агрегатом // *Биохимия.* — 2004. — Т. 69, №9. — С. 1196–1212.
17. *Гильчук П. В.* Оценка методов ренатурации для промышленного получения рекомбинантных белков из телец включения *Escherichia coli* в биологически активной форме // *Биополімери і клітина.* — 2004. — Т. 20, №3. — С. 182–192.
18. *Ciechanover A.* Intracellular protein degradation: from a vague idea, through the lysosome and ubiquitin-proteasome system, and to human diseases and drug targeting (Nobel lecture) // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2005. — V. 44. — P. 5944–5967.
19. *Janin J.* Principles of protein-protein recognition from structure to thermodynamics // *Biochimie.* — 1995. — V. 77, N7/8. — P. 497–503.
20. *Lo Conte L., Chothia C., Janin J.* Atomic structure of protein-protein recognition site // *J.Mol.Biol.* — 1999. — V. 285, N5. — P. 2177–2198.
21. *Stites W.* Protein-protein interactions: interface structure, binding thermodynamics, and mutational analysis // *Chem.Rev.* — 1997. — V. 97, N5. — P. 1233–1250.
22. *Schechter I., Berger A.* On the size of the active site in proteinases. I. Papain // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1967. — V. 27, N2. — P. 157–162.
23. *Blow D., Wright C., Kulka D. et al.* A model for the association of bovine pancreatic trypsin inhibitor with chymotrypsin and trypsin // *J.Mol.Biol.* — 1972. — V. 69, N 1. — P. 137–144.
24. *Janin J., Chothia C.* Stability and specificity of protein-protein interactions: the case of trypsin-trypsin inhibitor complex // *Ibid.* — 1976. — V. 100, N2. — P. 197–211.
25. *Laskowski M., Kato I.* Protein inhibitors of proteinases // *Ann.Rev.Biochem.* — 1980. — V. 49. — P. 593–626.
26. *Веревка С. В., Сытник А. И., Колодзейская М. В.* О роли S2'-стимуляции сериновых протеиназ в регуляции протеолиза // *Укр. биохим. журн.* — 1994. — Т. 66. — №6. — С. 32–38.
27. *Verevka S. V.* On the Structural Similarity of Serpine's Reactive Sites to Places of Activating Splitting in Protein's Precursors // *Ibid.* — 1995. — Т. 67, N5. — С. 24–28.
28. *Verevka S., Miroshnichenko O.* 1-X-3 motif in inter-protein recognition: structures, widespreading and possible practical application // *J.Mol.Recognit.* — 2001. — V. 14, N5. — P. 315–318.
29. *Travis J.* Interaction of human trypsin with chicken ovomucoid // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1971. — V. 44, N4. — P. 793–796.
30. *Мосолов В. В., Валуева Т. А.* Ингибиторы протеиназ и их функции у растений (обзор) // *Прикл. биохим. и микробиол.* — 2005. — V. 41, N3. — С. 261–282.
31. *Werle E., Maier L., Loffler F.* Uber einen kallikrein-inaktivator aus pflanzlichem material // *Biochem. Z.* — 1951. — V. 321, N 5. — P. 372–376.
32. *Мосолов В. В., Валуева Т. Л.* Растительные белковые ингибиторы протеолитических ферментов. — М.: ВИНТИ, 1993. — 207 с.

33. *Teng S. F., Sproule K., Hussain A., Lowe C. R.* A strategy for the generation of biomimetic ligands for affinity chromatography. Combinatorial synthesis and biological evaluation of an Ig binding ligand // *J. Mol. Recognit.* — 1999. — V. 12, N1. — P.67–75.
34. *Kolodzeyska M. V., Verevka S. V.* On the role of effector sites in serine proteinases hydrophobic chromatography // *Укр. биохим. журн.* — 1996. — Т.69. — №3. — С. 87–93.
35. *Ильина Л. В., Вережка С. В.* Лигандиндуцированное структурирование полиреактивных иммуноглобулинов // *Укр. биохим. журн.* — 2003. — Т. 75, №6. — С. 56–61.
36. *Бобровник С.А., Петрова Ю.И., Ефетов К.А.* Трансформация сывороточных иммуноглобулинов в полиреактивные антитела // *Укр. биохим. журн.* — 1997. — Т. 69, №3. — С. 36–42.
37. *Бобровник С. А.* Динамика взаимодействия полиреактивных иммуноглобулинов с иммобилизованными антигенами // Там же. — 1998. — Т. 70, №6. — С. 135–143.
38. *Roberts R.* Alpha-2-macroglobulin // *J.Med.* — 1985. — V. 16, N1–3. — P. 129–219.
39. *Sottrup-Jensen L., Petersen T., Magnusson S.* A thiol ester in α -2-macroglobulin cleaved during proteinase complex formation // *FEBS Letters.* — 1980. — V. 121, N1. — P. 275–279.
40. *Horowitz P. M.* Ironing of the protein folding problem? // *Nat. Biotechnol.* — 1999. — V. 17, N2. — P. 136–137.
41. *Demchenko A. P.* Protein folding and molecular chaperones: stochastic process under control // *Biophysics.* — 2000. — V. 45, N3. — P. 404–410.
42. *Bence N. F., Sampat R. M., Kopito R. R.* Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation // *Science.* — 2001. — V. 292, N 5521. — P. 1552–1555.
43. *Lindersson E., Beedholm R., Hojrup P. et al.* Proteasomal inhibition by a-synuclein filaments and oligomers // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279, N13. — P. 12924–12934.
44. *Valera A. G., Diaz-Hernandez M., Hernandez F. et al.* The ubiquitin-proteasome system in Huntington disease // *Neuroscientist.* — 2005. — V. 11, N6. — P. 583–594.
45. *Schellekens H., Casadevall N.* Immunogenicity of recombinant human proteins: causes and consequences // *J.Neurol.* — 2004. — V. 251. — Suppl 2: II. — P. 4–9.
46. *Шевель М. В., Вережка С. В.* Автоповреждения белковых препаратов: молекулярные механизмы и пути предотвращения // *Совр. пробл. токсикол.* — 2006. — Т. 3. — С. 41–45.
47. *MacLennan S., Barbara J.* Risks and side effects of therapy with plasma and plasma fractions // *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* — 2006. — V. 19, N1. — P. 169–189.
48. *Kaiser E. T., Kezdy F. J.* Secondary structures of proteins and peptides in amphiphilic environment // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1983. — V. 80, N4. — P. 1137–1143.
49. *Russel C. J., Thorgeirsson T. E., Shin Y-K.* Temperature dependence of polypeptide partitioning between water and phospholipid bilayers // *Biochemistry.* — 1996. — V. 35, N 80. — P. 9526–9532.
50. *Wimley W. C., White S. H.* Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interface // *Nat. Struct. Biol.* — 1996. — V. 3, N10. — P. 842–848.
51. *White S. H., Ladokhin A. S., Jashinghe S., Hristova K.* How membrane shape protein structure // *J. Biol. Chem.* — 2001. — V. 276, N 35. — P. 32395–32398.
52. *Rees D. C., De Antonio L., Eisenberg D.* Hydrophobic organization of membrane proteins // *Science.* — 1989. — V. 245, N 4917. — P. 510–513.
53. *Samatey F. A., Xu C., Popot J-L.* On the distribution of amino acid residues in transmembrane α -helix bundles // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1995. — V. 92, N 10. — P. 4577–4581.
54. *Heijne G. von.* Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and positive-inside rule // *J.Mol.Biol.* — 1992. — V. 225, N 2. — P. 487–494.
55. *Pan K. M., Baldwin M., Nguyen J. et al.* Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion protein // *Proc.Natl. Acad. Sci.USA.* — 1993. — V. 90, N 23. — P. 10962–10966.
56. *Horwich A. J., Weissman J. S.* Deadly conformation — protein misfolding in prion disease // *Cell.* — 1997. — V. 89, N4. — P. 499–519.
57. *Tatzelt J., Zuo J., Voellmy R., Scott M. et al.* Scrapie prion selectively modify the stress response in neuroblastoma cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1995. — V. 92, N 7. — P. 2944–2948.
58. *Kenward N., Landon M., Laszlo L., Mayer R. J.* Heat shock proteins, molecular chaperones and the prion encephalopathies // *Cell Stress and Chaperones.* — 1996. — V. 1, N1. — P. 18–22.
59. *Caughey B. and Raymond G. J.* The scrapie-associated form of prp is made from a cell-surface precursor that is both protease-sensitive and phospholipase-sensitive // *J. Biol. Chem.* — 1991. — V. 266, N 27, P. 18217–18223.
60. *Verevka S. V.* TSE and diabetes mellitus — two grins of the same evil? / *Prions: New Research.* — N.Y.: Nova Science Publishers, 2006. — P. 285–293.

61. Forloni G., Angeretti N., Chiesa R. et al. Neurotoxicity of a prion protein fragment // *Nature*. — 1993. — V. 362, N 6420. — P. 543–546.
62. Oesch B., Jensen M., Nilsson P. and Fogh J. Properties of the scrapie prion protein: quantitative analysis of protease resistance // *Biochemistry*. — 1994. — V. 33, N 19. — P. 5926–5931.
63. Safar J., Roller P., Gajdusek D., Gibbs C. Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity // *Protein Sci.* — 1993. — V. 2, N 12. — P. 2206–2216.
64. Fischer M., Roeckl C., Parizek P., Schwartz H. et al. Binding of disease-associated prion protein to plasminogen // *Nature*. — 2000. — V. 408, N 6811. — P. 479–483.
65. Pesaurd D., Barranco-Mendoza A. Bovine serum albumin and insulin-dependent diabetes mellitus. Is cow milk still a possible toxicological agent of diabetes // *Food and Chem. Toxicol.* — 2004. — V. 42, N5. — P. 707–714.
66. Knip M., Akerblom H. R. Early nutrition and later diabetes risk // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2005. — V. 569. — P. 142–150.
67. Couper J. J. Environmental triggers of type 1 diabetes // *J. Paediatr. Child Health.* — 2001. — V. 37, N3. — P. 218–220.
68. Verevka S. V. Prions and protein inhibitors of proteinases: structural analogies and their consequences. III. Additive risk factor of transgenic technologies // *Укр. біохім. журн.* — 2001. — 73, № 1. — С. 153–154.
69. Cao Y., Cao R., Veitonmaki N. Kringle structures and antiangiogenesis // *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents.* — 2002. — V. 2. — P. 667–681.
70. Mac Donald N. J., Murad A. C., Fogler W. E. et al. The tumor-suppressing activity of angiostatin protein residues withing kringles 1 to 3 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1999. — V. 264, N2. — P. 469–477.
71. Cairns R. A., Khokha R., Hill R. P. Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view // *Curr. Mol. Med.* — 2003. — V. 3, N7. — P. 659–671.

ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ СТРУКТУРИ ТРАНСГЕННИХ БІЛКІВ І ЗУМОВЛЕНІ НИМИ ФАКТОРИ РИЗИКУ

С. В. Верьовка

Інститут отоларингології
ім. О. С. Коломійченка АМН України, Київ
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ

E-mail: verevka@biochem.kiev.ua

Розглянуто проблеми, зумовлені розвитком технології трансгенних продуктів харчування. У світлі даних про молекулярні механізми формування структури білків та забезпечення міжбілкової комплементарності обґрунтовується положення про комплексний характер функціонування структуроутворювальних, підтримувальних та елімінувальних систем. Обговорюються шляхи порушення трансгенними продуктами міжбілкового узгодження і його можливі наслідки.

Ключові слова: трансгенні білки, фактори ризику, шаперони, місфолдинг, пріони.

ON SOME PECULIARITIES OF TRANSGENIC PROTEINS' STRUCTURE FORMATION AND CONNECTED RISK FACTORS

S. V. Verevka

Academy of Medical Sciences of Ukraine
Kolomyychenko Institute of Otolaryngology
Palladin Institute of Biochemistry
of National Academy of Ukraine, Kyiv

E-mail: verevka@biochem.kiev.ua

The problems created by the development of transgenic food technologies are under consideration. Generalization of the data on the molecular mechanisms of the protein structure formation and processing allowed to base the principle of the correlative action of the structure-forming, structure-keeping and protein-eliminating systems. The ways of the possible disturbances of such inter-protein coordination by transgenic proteins as well as their possible consequences are discussed.

Key words: transgenic proteins, risk factors, chaperones, misfolding, prions.