

Нативная агрегация как механизм формирования временных клеточных структур, необходимых для всех форм клеточной активности, трансформаций и передачи сигналов

В.В. Матвеев

Лаборатория физиологии клетки, Институт цитологии РАН,
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4
Электронный адрес: vladimir.matveev@gmail.com

Эта статья опубликована за рубежом: Vladimir Matveev. Native aggregation as a cause of origin of temporary cellular structures needed for all forms of cellular activity, signaling and transformations. Theoretical Biology and Medical Modelling 2010, 7:19. Адрес статьи: <http://www.tbiomed.com/content/7/1/19>

Адрес рукописи на русском языке: <http://vladimirmatveev.ru/nativeaggregationrus.html>

Автор будет признателен за критические замечания

Согласно предлагаемой гипотезе, нативная агрегация — это обратимая высокоспецифичная агрегация белков, находящаяся под генетическим контролем (запрограммированная агрегация), в результате которой формируются временные структуры. Предполагается, что догма Анфинсена может быть распространена на межбелковые взаимодействия: состав и аминокислотная последовательность определяют не только вторичную структуру и другие структурные уровни белка, но и характер его взаимодействия с другими белками (агрегации, ассоциации). Функционирование клетки (или отдельной структуры) рассматривается как повторяющаяся серия переходов между двумя состояниями, состоянием покоя и активности (модель двух состояний). В состоянии покоя ключевые белки клетки (или отдельной структуры) представлены неактивными формами: нативно-развернутыми и глобулярными белками. При активации, в нативно-развернутых белках (включая развернутые участки белков) начинают формироваться временные вторичные структуры (в результате сворачивания полипептидной цепи), а в глобулярных белках вторичные структуры становятся доступными для взаимодействия в результате плавления глобул. Индуцированные вторичные структуры обеспечивают высоко специфичные внутри- и межбелковые взаимодействия. В результате такого взаимодействия появляются временные структуры, выполняющие функции, необходимые для обеспечения функциональной активности.

"One of the principal objects of theoretical research in any department of knowledge is to find the point of view from which the subject appears in its greatest simplicity."

Josiah Willard Gibbs (1839-1903)

Введение

К настоящему времени в клетке найдено множество взаимодействий, сигнальных путей и факторов разного рода. Естественно желание исследователей найти общие закономерности в механизмах клеточной регуляции. Я хотел бы предложить субстанциональный подход к проблемам физиологии клетки, а именно ту структурную основу, которая порождает сигналы и служит основой функционирования разнообразных клеточных механизмов.

Методологической основой предлагаемой гипотезы являются результаты исследований научных школ Д.Н. Насонова (Насонов, 1962) и Г. Линга (Ling, 1962, 1984, 1992, 2001, 2006; Линг, 2008), получившие новое звучание за последние 20-30 лет благодаря успехам физики белка (Финкельштейн и Птицын, 2005) в изучении свойств глобулярных белков, их развертывания и свертывания, а также открытию новых состояний белковой молекулы: нативно-развернутого и расплавленной глобулы. Ключевым для логики этой статьи является положение о том, что специфичность взаимодействий полипептидных цепей друг с другом (на внутри- и межмолекулярном уровнях) способны обеспечивать только вторичные структуры, к которым в первую очередь относятся α -спирали и β -листы.

Трудами школы Насонова было открыто и исследовано фундаментальное явление — неспецифическая реакция клетки на внешние воздействия (Насонов, 1962), а труды Линга и его последователей (Линг, 2008) позволяют понять механизмы этого явления.

Упомянутая реакция клетки названа неспецифической потому, что разнообразные физические и химические факторы вызывают в клетке один и тот же комплекс структурных изменений: увеличение мутности и макроскопической вязкости цитоплазмы, увеличение адсорбции гидрофобных веществ цитоплазматическими белками. Принципиально важным является то обстоятельство, что такие же изменения происходят в клетке и тогда, когда она переходит в активное состояние: при мышечном сокращении, потенциале действия, при усилении секреторной активности. То есть, с точки зрения структурных изменений, нет принципиальной разницы между результатом действия на клетку гидростатического давления и, например, мышечным сокращением. В обоих случаях белки агрегируют.

Причиной этих изменений Насонов назвал начальные стадии денатурации клеточных белков потому, что изменения свойств изолированных белков при денатурации очень похожи на изменения в цитоплазме при неспецифической реакции. В итоге, была создана денатурационная теория возбуждения и повреждения клеток (Насонов, 1962). Под денатурацией обычно понимают развертывание глобулярных белков и разрушение вторичных структур. Ниже я дам свое определение начальных стадий денатурационных изменений для глобулярных и нативно-развернутых белков.

Одним из ключевых понятий физиологии является *состояние покоя* клетки. В скрытом виде оно присутствует в представлении о пороговом характере действия раздражителей на клетку, сыгравшим историческую роль в развитии физиологической науки. Именно порог действия является границей между двумя состояниями — покоя и активности. Но так случилось, что все наши знания о клетке — это знания об активной клетке, а не о клетке в состоянии покоя. Именно в активной клетке происходят разнообразные изменения, поддающиеся регистрации. В покоящейся клетке ничего не происходит, и зарегистрировать в ней нечего. Тем не менее, очевидно, что состояние покоя — исходное состояние клетки, которая является точкой отсчета для всех изменений, происходящих в ней.

Что представляет собой клетка в структурном отношении в состоянии покоя? Ясный ответ на этот вопрос я нашел только у Линга (Линг, 2008). Смысл этого ответа можно выразить так: если все белки клетки в состоянии покоя уложить в одну линию, то окажется,

что бóльшая часть пептидных связей этого суперполипептида доступна растворителю (воде), и лишь незначительная часть включена во вторичные структуры. При активации клетки это соотношение между развернутыми и свернутыми участками резко меняется на обратное: доля пептидных связей, доступных растворителю резко снижается, а число пептидных связей, включенных во вторичные структуры, значительно возрастает. Предложенные Лингом два крайних состояния белков клетки дают повод для дальнейших рассуждений.

Если объединить подход Линга с теорией Насонова, то мы получим ряд интересных следствий. Прежде всего, ясно, что белки с максимально развернутой структурой потому составляют структурную основу покоящейся клетки, что они неактивны, т.е. не взаимодействуют с другими белками и макромолекулами. Ситуация меняется при надпороговом воздействии на клетку: в ее ключевых полностью или частично развернутых белках начинается процесс сворачивания, при котором образуются новые и новые вторичные структуры. Благодаря этим новым вторичным структурам белки становятся реакционноспособными, а именно, начинается внутримолекулярная агрегация (сворачивание отдельных полипептидов в глобулы) и межмолекулярная агрегация (взаимодействие одних белков с другими). Отличительной чертой этих агрегационных процессов является их сугубо специфический характер, который обеспечивается аминокислотным составом, формой и размером вторичных структур. Возникающие структуры имеют физиологический смысл, и поэтому такая агрегация является нативной, а вызвавшие ее вторичные структуры являются центрами нативной агрегации. Другим источником вторичных структур, необходимых для нативной агрегации, являются расплавленные глобулы.

Способность клетки вернуться в исходное состояние, состояние покоя, означает, что нативная агрегация полностью обратима, а структуры, возникшие в ходе нативной агрегации, — временные, и разбираются, как только в них исчезает необходимость. Нативная агрегация может охватывать как всю клетку, так и отдельные органеллы, компартменты, структуры, а активация белков имеет пороговый, а не спонтанный характер.

Смысл предлагаемой гипотезы нативной агрегации состоит в том, что первопричиной любых функциональных изменений в клетке является появление в результате нативной агрегации *временных* структур, непрерывно возникающих и распадающихся в процессе ее жизнедеятельности. Поскольку нативная агрегация инициируется внешним или регуляторным воздействием, а возникшие в результате этого структуры носят временный характер, их можно назвать сигнальными.

Сигнальные структуры могут обладать разнообразными свойствами: (1) они могут быть центрами связывания ионов, молекул и белков; (2) они могут обладать ферментативной активностью; (3) они могут образовывать каналы и межклеточные контакты; (4) они могут служить матрицей, организующей взаимодействие молекул в синтетических и транспортных процессах; (5) они могут служить рецепторами сигнальных молекул; (6) они могут служить основой для построения еще более сложных надмолекулярных структур. Эти структуры «вспыхивают» в пространстве клетки подобно сигнальным огням, выполняют свою роль и исчезают, чтобы появиться вновь в другом месте и в другое время. Смысл существования структурных «вспышек» в том, что при переходе в активное состояние клетке необходимы новые ресурсы, функции, механизмы, регуляторы и сигналы. Как только клетка переходит в состояние покоя, необходимость в этих структурах исчезает и они разбираются. Крайними примерами нативной агрегации могут служить мышечное сокращение, конденсация хромосом, возникновение веретена деления, взаимодействие лиганда с рецептором.

Таким образом, в статье будет рассмотрен смысл и значение нативной агрегации как универсальной структурной основы активной клетки. В основе патологических состояний лежит неспособность клетки вернуться в состояние покоя и ошибки при формировании сигнальных структур. Представление о нативной агрегации основывается на трех столпах: 1) активность (возбуждение) клетки сопровождается обратимой агрегацией белков (школа Насонова); 2) функционирование клетки или отдельных ее структур может рассматриваться как непрерывный переход между двумя состояниями (активности и покоя), ключевую роль в

котором играют нативно-развернутые белки (теория Линга); 3) специфичность взаимодействий частей одной полипептидной цепи друг с другом (свертывание) или взаимодействие полипептидных цепей между собой (самосборка, агрегация) способны обеспечить только вторичные структуры белка.

Целью настоящей статьи является изложение принципов, а не обзор фактов, соответствующих этим принципам.

Нативная агрегация в ретроспективе

Возможно, наиболее изученным неспецифическим ответом клетки на внешнее воздействие является ответ клетки на действие фиксирующих растворов. Долгое время в истории науки, клетки были для исследователей оптически пустыми образованиями. Появление методов фиксации и окрашивания произвело революцию в цитологии, так как эти приемы открыли взору исследователей множество клеточных структур, о существовании которых они и не подозревали. После периода эйфории возникли сомнения, а являются ли эти структуры подлинными или они — результат фиксации, *денатурации* нативного вещества клетки?

Опасность серьезных ошибок, когда артефакты фиксации могли рассматриваться как реальные структуры, стала предметом всеобщего внимания с 1899 г. (подробности здесь: Wilson, 1928, Ch.1), когда было показано, что коагуляция гомогенных растворов белков приводит к возникновению структур, весьма сходных со структурами, наблюдаемыми на фиксированных препаратах клеток (см. Porter, 1984, Fig. 24). Причем форма таких искусственных структур зависела от химической природы фиксатора, его концентрации, от концентрации белка в растворе, от температуры и других условий. В исследованиях морфологии клетки наступил явный кризис.

Однако было очевидно и другое. В оптически пустой части клетки могли возникать видимые структуры не только при фиксации, но и при переходе клетки в активное состояние. Сравнительные наблюдения над фиксированными препаратами и живой клеткой показывали, что там, где структура появлялась *in vivo*, она наблюдалась и на фиксированном препарате. Явное подобие между нативными структурами и структурами, полученными в результате фиксации, давали основание считать, что ряд клеточных структур формируются не только при фиксации, но и при активации той или иной клеточной функции, когда происходит самосборка новых структур, которых не было в покоящейся клетке (подробности здесь: Wilson, 1928, Ch.1). Таким образом, дискуссия привела к весьма важному выводу о том, что при всей опасности получения артефактов, несомненным остается и другое: в процессе агрегации денатурирующих клеточных белков они взаимодействуют друг с другом не хаотично, а по определенному плану, закономерно (это я и называю нативной агрегацией). Законы этого взаимодействия приводят к формированию временных структур, необходимых клетке для функционирования в новых условиях. При фиксации и дегидратации этот процесс идет вначале «как полагается» (имеет место самосборка реальных клеточных структур), но заходит слишком далеко по завершении процесса приготовления препарата, когда агрегация становится необратимой, а возникшая в результате агрегации структура становится «трупом». Если бы взаимодействие белков в ходе агрегации было бы хаотичным, мы до сих пор мало что знали о строении клетки.

Ход нативной агрегации определяется, по-видимому, тем обстоятельством, что содержимое клетки в состоянии покоя не является гомогенным, а обладает структурой, скрытой от наблюдения под световым микроскопом, но обнаруживает себя с началом нативной агрегации. Роль структуры, направляющей нативную агрегацию может играть, например, «микротрабекулярная» система Портера (Porter and Tucker, 1981), которую можно определить «as that which is in the background of all the visible membranous organelles and all the visible elements of the cytoskeleton; e.g., that which has been invisible up until now and which

we wish to “see” microscopically» (Heuser, 2002). Такая сетка могла бы выступать в качестве центра «кристаллизации» или центром «притяжения» агрегирующих белков. Но это только пример, который я привожу для ясности. Центрами кристаллизации могут служить и наиболее чувствительные белки, которые первыми реагируют конформационными изменениями на изменения в среде и становятся агрегатоспособными. Так или иначе, в результате нативной агрегации скрытые структуры становятся видимыми в микроскоп.

Фултон (Fulton, 1982), убежденная последовательница Портера, пошла еще дальше и высказала точку зрения, согласно которой, “the cytoplasm is so compact that it is only a few times more open than a crystal”. Видимо, в литературе накопилось достаточно данных для того, чтобы быть вполне уверенным, что содержимое клетки следует рассматривать как структурированную систему, которая направляет нативную агрегацию в нужное русло. В качестве одного из примеров можно указать на данные Бало-Банги и др. (Balo-Banga et al., 1980b): двойное лучепреломление ядер лимфоцитов усиливалось после фиксации этанолом. То есть корректная фиксация приводит к возникновению новых более упорядоченных структур. Однако особенно интересными являются случаи, когда нативная агрегация, как я ее называю, имеет место в процессе нормального функционирования клетки. Так, в той же работе (Balo-Banga et al., 1980b) показано, что активация лимфоцитов специфическими антигенами или гаптенами приводит к значительному усилению двойного лучепреломления ядра. Это же явление имело место и в случае активации аллергенами лимфоцитов периферической крови пациентов, страдающих лекарственной аллергией (Balo-Banga et al., 1980a).

Если интенсивность действующего на клетку фактора будет нарастать, то его активирующее действие сменится повреждающим. Так, исследования Иннерс и Бендет (Inners and Bendet, 1969) термической денатурации ДНК бактериофага T2 и сперматозоидов (Bearden and Bendet, 1972) показали, что при необратимой денатурации структур, их способность к двойному лучепреломлению утрачивается. Данные такого рода свидетельствуют о том, что при определенных условиях воздействие на клетку нагревом, органическими растворителями и т.п. вызывают не нативную агрегацию, а разрушение, дезорганизацию внутриклеточных структур; иначе говоря, разрушение структуры может наступать вслед за нативной агрегацией. К сожалению, в литературе явно прослеживается увлечение грубыми изменениями в структуре цитоплазмы и органелл потому, что их легче исследовать.

Таким образом, история вопроса показывает, что при применении адекватных методов исследования, нативная (программируемая) агрегация белков, приводящая к самосборке различных клеточных структур, является обычным явлением в жизни клетки. Примером тому является универсальная реакция живой клетки (Matveev, 2005).

Универсальная реакция живой клетки и нативная агрегация

Почему нативная агрегация белков не идет в клетках, находящихся в состоянии покоя и начинается только при ее активации (например, мышечное сокращение, потенциал действия) и при повреждении? Для ответа на этот вопрос обратимся к денатурационной теории Насонова (Насонов, 1962). Согласно этой теории, возбуждение клетки имеет место только тогда, когда ее белки испытывают начальные стадии денатурационных изменений.

Первым, вероятно, на сходство изменений в активной цитоплазме с денатурацией изолированных белков обратил внимание Мирский (Mirsky and Pauling, 1936). Он пришел к выводу, что денатурационные изменения белков возникают при оплодотворении яйцеклетки (Mirsky, 1936a) и при фоторецепции (Mirsky, 1936b). Вот как он об этом говорит в последней из указанных работ: “...There is evidence indicating that light denatures a conjugated protein, visual purple, and that denaturation reverses in the dark.” Однако его исследования в этом направлении не носили систематического характера.

Насонов и его последователи изучили действие самых разнообразных факторов (химические соединения, pH, гидростатическое давление, механические воздействия) на клетки различных типов. В результате была выявлена закономерность: независимо от характера воздействия и типа клетки, ее ответная реакция представляла собой однотипный (неспецифический) комплекс *синхронных* изменений. Эти изменения носили двухфазный характер: макроскопическая вязкость цитоплазмы сначала снижалась, затем возрастала; связывание витальных красителей клеточными структурами (в условиях диффузионного равновесия) сначала снижалось, затем возрастало; в первую фазу реакции цитоплазма просветлялась, во вторую — мутнела. Были изучены и другие показатели. Первая фаза указанной реакции не имеет отношения к предмету настоящей статьи потому, что она является вариацией состояния покоя. Для нас представляет интерес вторая фаза, структурной основой которой является агрегация белков (рис. 1). Эта фаза и есть фаза активации клеточных функций (Насонов, 1962).

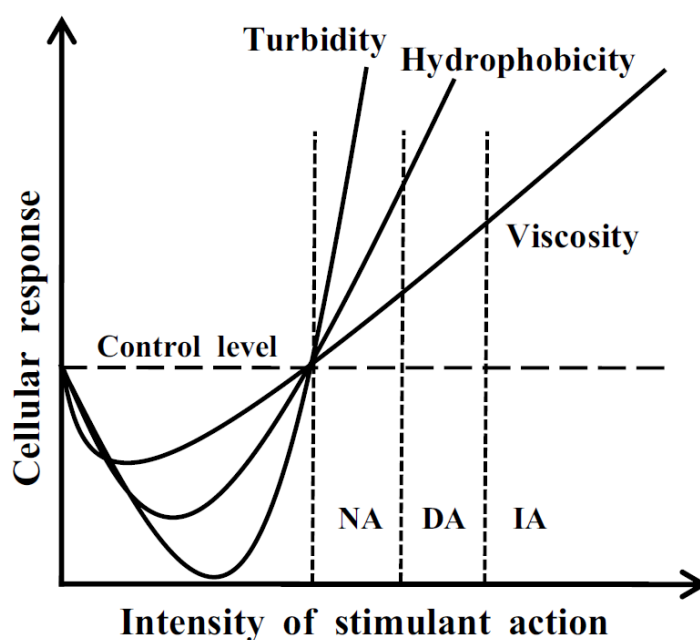


Рис. 1. Характер неспецифического ответа клетки (Насонов, 1962) в зависимости от силы внешнего воздействия (схема). При достижении порога, начинается первая фаза клеточного ответа, во время которой ее прозрачность возрастает, а гидрофобность и макроскопическая вязкость снижаются. Затем начинается вторая фаза клеточного ответа, в течение которой все представленные показатели значительно превышают контрольный уровень (контрольный уровень в данном случае означает состояние покоя клетки).

Можно предложить следующие стадии развития второй фазы: NA — стадия нативной агрегации, когда активируются различные клеточные функции; DA — стадия повреждающей агрегации, когда формируются сигналы к апоптозу, раковой трансформации и к другим патологическим состояниям; IA — стадия необратимой агрегации, приводящая к гибели клетки.

Эта вторая фаза, на языке школы Насонова, называлась фазой возбуждения и повреждения. Субстанциональные изменения в клетке в эту фазу поразительно напоминают денатурацию изолированных белков, и поэтому Насонов назвал свою теорию, объясняющую ответную реакцию клетки на внешние воздействия, денатурационной теорией возбуждения и повреждения. Согласно этой теории, начальные стадии денатурационных изменений, когда они еще обратимы, лежат в основе возбуждения клетки (активация секреторной функции,

мышечного сокращения, потенциала действия etc.). Более глубокие изменения белков приводят к нарушениям нормального функционирования клетки, но еще могут быть обратимыми. Затем, при дальнейшем развитии повреждения, денатурационные изменения становятся необратимыми, клетка погибает.

Особенностью клеточной реакции, открытой и исследованной школой Насонова, был ее *неспецифический* характер: чем бы мы ни действовали на клетку, ее белки агрегировали (как при фиксации); любая клеточная активность также сопровождалась агрегацией белков (это особенно хорошо видно в случае мышечного сокращения). Точно так же вели себя и изолированные белки при денатурации: любой денатурирующий фактор вызывал их агрегацию.

В этом универсализме клеточного ответа таилась загадка, но в век увлечения специфическими взаимодействиями неспецифические явления не могли привлечь внимания. Тем не менее, очевидно, что открытая школой Насонова неспецифическая реакция клетки — это фундаментальное природное явление, такое же, как клеточное деление или раковое перерождение. Внимание к нему оправдано потому, что явления природы, в отличие от теорий, не могут быть ошибочными.

Неспецифический характер рассматриваемой клеточной реакции — это поверхностное впечатление. Смерть тоже явление неспецифическое, но процессы, которые к ней приводят, отличаются разнообразием и могут быть в высшей степени специфическими. Точно также и в основе агрегации белков могут лежать специфические взаимодействия. Если мы будем отрицать наличие специфических механизмов в агрегации белков клетки, мы не сможем понять, почему клеточный стресс инициирует такие процессы, как пролиферация, дифференциация, старение, апоптоз, некроз, митотическая смерть (Proskuryakov et al., 2003). С другой стороны, очевидно, что при всей специфичности взаимодействий, приводящих к агрегации белков, реакция клетки выглядит неспецифично потому, что любая агрегация, специфическая или нет, заканчивается образованием белковых комплексов. Поэтому правильнее говорить не о неспецифичности, а об *универсальности* комплекса структурных и функциональных изменений в клетках, изученных школой Насонова. Поэтому я и предложил называть этот типичный ответ *универсальной реакцией живой клетки* или протореакцией, потому что есть основания считать ее самым древним типом реагирования клеток на внешние воздействия (Matveev, 2005).

Итак, именно денатурация белков делает эти полимеры активными. Их активность проявляется в том, что только денатурированные белки начинают взаимодействовать друг с другом. Это взаимодействие представляется мне специфическим и закономерным, а результатом нативной агрегации являются новые структуры, отсутствовавшие в состоянии покоя и имеющие физиологический смысл для активного состояния. Иначе говоря, денатурационные изменения делают белки *реакционноспособными*. До тех пор, пока эти изменения обратимы, клетка способна разобрать образовавшиеся временные структуры и вернуться в исходное состояние — состояние покоя. При повреждении, когда агрегация белков становится слишком продолжительной или необратимой, в клетке возникают патологические изменения, которые могут привести ее к гибели. Пороговый характер реакции клетки означает, что состояние покоя и активное состояние являются разными термодинамическими состояниями системы, разделенными энергетическим барьером; это относится не только к клетке в целом, но к отдельным ее компонентам (Линг, 2008).

Теперь пришло время задаться вопросом о том, что делает агрегацию белков специфичной? Ответ на этот вопрос дает нам физика белка. Установлено, что правильное свертывание полипептида в глобулу, как и уникальная структура самой глобулы, обеспечивается специфическим взаимодействием между *вторичными структурами* белка (Финкельштейн и Птицын, 2005). Рассмотрим такую структуру как α -спираль. С другими вторичными структурами она взаимодействует своей поверхностью. Поверхность α -спирали «инкрустирована» полярными (гидрофильными) и неполярными (гидрофобными) группами. Взятые сами по себе такие группы способны только к неспецифическим взаимодействиям,

но вторичные структуры способны придать этим взаимодействиям специфический характер. В этом их биологический смысл. Действительно, в зависимости от аминокислотного состава, топография гидрофобных групп на поверхности α -спирали может сильно варьировать. Если две α -спирали имеют *комплементарную* топографию гидрофобных аминокислотных остатков, то такие вторичные структуры будут «опознавать» друг друга и ассоциироваться с образованием гидрофобного ядра (принцип соответствия «ключа» «замку» работает и здесь). Благодаря тому же *топографическому* фактору, полярные группы могут образовывать на поверхности вторичных структур «ландшафт», комплементарный поверхности нуклеиновых кислот. Обеспечение специфичности взаимодействия путем уникального распределения функциональных групп белка по поверхности является основным назначением всех вторичных структур белка. Принцип структурной комплементарности имеет универсальную физическую основу и реализуется не только во внутрибелковых взаимодействиях (в сформировавшихся глобулярных белках и в процессе их сворачивания), но и в случае межбелковых взаимодействий (нативная агрегация), включая взаимодействия белок-нуклеиновая кислота.

Когда воздействие на клетку или клеточную структуру становится надпороговым, в (1) нативно-развернутых белках (или в развернутых участках белков) начинают формироваться вторичные структуры, а в (2) расплавленных глобулах эти структуры становятся доступными для взаимодействия с вторичными структурами других белков и с нуклеиновыми кислотами. Такие вторичные структуры, индуцированные внешним воздействием, являются *центрами нативной агрегации*. Таким образом, первое, что происходит в активированной клетке — это появление новых вторичных структур, способных избирательно взаимодействовать друг с другом с образованием третичных структур, четвертичных и т.д. Белки, в которых вторичные структуры появляются при таких обстоятельствах, утрачивают свою былую инертность и становятся реакционноспособными.

Предлагаемый подход к пониманию механизмов клеточных реакций по-новому ставит вопрос о нативном и денатурированном состоянии белка. В нативном состоянии ключевые белки клетки инертны, нереакционноспособны, они не взаимодействуют друг с другом и с другими биополимерами. Утрата состояния инертности и есть денатурация. При денатурации развернутых полипептидных цепей на них появляются вторичные структуры, а при денатурации (плавлении) глобулярных белков их вторичные структуры модифицируются и «всплывают» на поверхность из гидрофобного ядра (становятся доступными для внешних взаимодействий). И в том, и в другом случае вторичные структуры готовы к взаимодействию. Другими словами, можно выделить два предельных состояния белка: полностью свернутое (глобулярный белок) и полностью развернутое. Между этими неактивными (нативными) состояниями может существовать множество промежуточных, активных, форм, которые и обеспечивают нативную агрегацию. Таким образом, у белка только два состояния неактивны (это и есть нативные состояния). Во всех остальных случаях он активен, что проявляется в его способности к нативной агрегации.

Предложенный механизм нативной агрегации объясняет увеличение объема гидрофобной фазы клетки при протореакции (Matveev, 2005) и структурные изменения в ней при универсальной реакции живой клетки (Насонов, 1962). При формировании вторичных структур полярные группы пептидных связей уходят от контакта с водой и образуют водородные связи между собой. Уже только поэтому гидрофобность полипептида с вторичными структурами выше, чем у развернутого полипептида-предшественника. Объем гидрофобной фазы возрастает еще больше, когда вторичные структуры сливаются с образованием гидрофобных доменов (ядер). Вторая причина, по которой гидрофобная фаза клетки увеличивается в объеме, — это появление расплавленных глобул. У нативных глобулярных белков гидрофобное ядро представляет собой твердое тело со сравнительно небольшой поверхностью, слабо взаимодействующим с гидрофобными веществами (именно поэтому клетка в состоянии покоя гидрофильна). При плавлении, гидрофобное ядро перестает быть твердым телом (Финкельштейн и Птицын, 2005, лекция 17), составляющие

его элементы становятся гораздо более подвижными относительно друг друга, ядро разрыхляется и становится доступным воде и растворенным в ней веществам (площадь гидрофобных контактов увеличивается). Если в растворе есть гидрофобные соединения, то они получают возможность проникать в ядро расплавленной глобулы и концентрироваться в этой гидрофобной фазе.

Белки в возбужденном состоянии способны не только к новым внутримолекулярным взаимодействиям, но и к взаимодействию с другими белками. Физика белка не дает никаких запретов на этот счет. Нативная агрегация (образование специфических агрегатов) объясняет увеличение мутности клетки и макроскопической вязкости цитоплазмы и ядра. Таким образом, наблюдаемые изменения при протореакции находят простое объяснение, основанное на данных физики белка (Финкельштейн и Птицын, 2005).

В этом разделе важное место было уделено клетке в состоянии покоя. Рассмотрим его подробнее.

Что представляет собой клетка в состоянии покоя?

Для изучения любого процесса важно иметь точку отсчета. Например, было бы невозможно понять механизм мышечного сокращения без представления о состоянии покоя сократительного аппарата. Исходя из опыта классической физиологии, необходимо признать, что представление о состоянии покоя клетки (как и отдельных ее частей) имеет важное значение для понимания механизмов ее активации. Здесь мы вновь возвращаемся к вопросу о структуре клетки в покое. Тот факт, что покоящаяся клетка, в отличие от активированной, почти полностью прозрачна, свидетельствует о незначительном количестве белковых ассоциатов. Кроме того, клетка в покое гидрофильна, так как в условиях диффузионного равновесия она не связывает витальных красителей (Насонов, 1962), являющихся гидрофобными веществами (Matveev, 2005). Эти существенные особенности покоящейся клетки должна объяснить ее структура.

Первым предположение о том, что структура покоящейся клетки определяется нативно-развернутыми белками, высказал в 1952 году Линг (Ling, 1952). Это представление окончательно оформилось к 1965 году (Ling, 1965), а итоги развития этого направления подведены в 2006 году (Ling, 2006). Важнейшим свидетельством в пользу такого взгляда является одинаковый характер *равновесного* распределения веществ между клеткой и средой с одной стороны, и между модельными системами и средой, с другой. В качестве модельной системы исследованы, например, диализные мешки из целлофана, заполненные концентрированными растворами гидрофильных и электрически нейтральных *линейных* полимеров, все звенья цепи которых доступны воде. Закон распределения, то есть зависимость равновесного распределения веществ от их концентрации в среде одинаков для модельных систем и для живой клетки. Поскольку распределение веществ изучали в условиях диффузионного равновесия, этот результат означает, что ключевой физико-химический фактор, определяющий характер распределения, в моделях и в клетке *одинаков* и обеспечивается развернутыми биополимерами. Представляется очевидным, что из всех полимеров клетки на эту роль способны претендовать только белки — самые массовые полимеры клетки (Ling, 1965).

Что же это за фактор? И клетки, и модели имеют общую для них особенность: если исследуемый компонент раствора не адсорбируется на полимере внутри системы, то его равновесная концентрация во внутренней среде всегда ниже, чем в омывающем растворе. Модельные системы, в силу своей простоты, позволяют понять это явление, оно обусловлено тем, что вещества хуже растворяются в воде системы, чем в воде омывающего раствора. Физика дает единственно возможное объяснение этому различию: вода в клетке и в модельных системах более упорядочена, чем объемная, поэтому встраивание молекулы растворенного вещества в растворитель с более жесткими связями энергетически невыгодно,

и они вытесняются из системы. Но чем объяснить, что вода в присутствии линейных полимеров упорядочивается? Модельные системы, в которых нет ничего, кроме полимера, воды и растворенного вещества, дают очевидное объяснение: если вода адсорбируется закономерно повторяющимися звеньями полимера, то и сама она упорядочивается в пространстве (имеет место многослойная адсорбция). Кроме того, у адсорбированных молекул воды изменяются электрические свойства.

Несмотря на все разнообразие белков, все они имеют абсолютно одинаковый полипептидный *остов*, различия между белками обусловлены лишь боковыми цепями. Полипептидный остов всех белков представляет собой правильное чередование положительных (NH) и отрицательных (CO) зарядов пептидных связей, причем расстояние между этими группами оказывается соизмеримым с размером молекул воды и длиной водородных связей между ними. Иначе говоря, расположение указанных диполей вдоль полипептидного остова оказывается в структурном отношении комплементарным структуре воды. Другая особенность групп пептидной связи состоит в том, что они образуют водородные связи либо друг с другом (во вторичных структурах), либо с водой (развернутые участки полипептидной цепи) (Финкельштейн и Птицын, 2005, лекция 4). Однако возникает вопрос, почему взаимодействие воды с функциональными группами пептидных связей так сильно меняет ее свойства? Для ответа на этот вопрос обратимся к свойствам электрических диполей.

Важное свойство дипольных молекул состоит в том, что их дипольный момент не является величиной постоянной, а зависит от их взаимодействий с другими дипольными молекулами (Spackman et al., 2007). Пример: в газовой фазе дипольный момент молекулы воды равен 1.85 D, а в жидкой — 2.9 D. То есть взаимодействие молекул воды друг с другом приводит их к взаимной поляризации — увеличению собственного дипольного момента на 60% (Kemp, Gordon, 2008). А если молекула воды будет взаимодействовать с диполем более сильным, чем она сама? Дипольный момент пептидной группы оценивается в 3.5 D (Collins and Leadbeater, 2007). Если вода будет взаимодействовать с этими, более сильными, диполями, то ее молекулы будут поляризоваться в еще большей степени, и их водородные связи с другими молекулами будут становиться более прочными. Усиление водородных связей делает первый адсорбционный слой воды стабильным и способным притягивать к себе и связывать все новые и новые свободные молекулы воды с образованием все новых адсорбционных слоев. Таким образом, более сильные диполи на адсорбирующей поверхности являются ключевой предпосылкой для многослойной адсорбции полярных молекул.

Из-за усиления водородных связей в многоэтажном адсорбционном слое воды, проникновение в него других молекул (включая саму воду) становится энергетически невыгодным потому, что это потребует разрыва более прочных водородных связей между ее молекулами в слое, чем в объемной фазе. Это объясняет, почему связанная вода является плохим растворителем по сравнению с фазой, где молекулы воды взаимодействуют только друг с другом. По этой термодинамической причине концентрация *любых* веществ в фазе адсорбированной воды будет всегда меньше, чем в жидкой фазе.

Однако все начинает меняться, если развернутый полипептид, адсорбировавший воду, начинает сворачиваться с образованием вторичных структур. В этом процессе пептидные группы отказываются от водородных связей с водой и образуют их между собой. Прежде связанная вода десорбируется и приобретает свойства объемного растворителя (Ling, 1965, 2006, 2007). Обоснованность такого взгляда на взаимодействие полипептидов и других гидрофильных полимеров с водой получило убедительное экспериментальное подтверждение (Zheng and Pollack, 2003; Zheng et al., 2006).

А какова роль глобулярных белков? Именно они являются вторым важным белковым компонентом клетки в состоянии покоя. Это наиболее изученный тип белков, выполняющих структурные и ферментативные функции. Их твердое ядро недоступно воде, а участки

полипептидной цепи, не содержащие вторичных структур, недостаточно протяженные, чтобы существенно влиять на состояние внутриклеточной воды (Линг, 2008).

Итак, в состоянии покоя, физические свойства белкового матрикса клетки определяются частично или полностью развернутыми белками и белками глобулярными (к последним относятся, разумеется, и сложные белки с несколькими глобулярными доменами). В контексте этой статьи именно такие белки имеет смысл называть нативными. Структурные и функциональные особенности состояния покоя клетки определяются развернутыми белками (Линг, 2008).

Остается вопрос о том, почему состояние покоя клетки относительно стабильно и может существовать неопределенно долго? Линг полагает, что это объясняется стабилизирующим действием на развернутые белки различных лигандов, связанных в состоянии покоя клетки с нативно-развернутыми белками: ионов, низкомолекулярных органических соединений, гормонов и т.д. Важнейшим лигандом покоя белков является, по Лингу, АТФ (Ling, 1977). Если некоторое воздействие приводит к расщеплению АТФ или к диссоциации других лигандов покоя, то это приводит к свертыванию нативно-развернутого белка. В нем появляются вторичные структуры, которые делают полипептид реакционноспособным. Начинается нативная агрегация, в ходе которой формируются сигнальные структуры. Нативно-развернутые белки являются, по-видимому, самыми чувствительными элементами покоящейся клетки, поскольку их свертывание является термодинамически выгодным, так как при десорбции воды энтропия системы возрастает (вода является самым массовым компонентом клетки). Кроме того, лиганды покоя непрочно связаны с нативно-развернутыми белками, так как эта связь нековалентная, а АТФ может расщепляться ферментативно. В итоге, отдельные компоненты клетки или вся клетка в целом представляется системой, структурным содержанием жизнедеятельности которой является обратимый переход из состояния покоя в активированное (возбужденное) состояние, обусловленное обратимым переходом белков из состояния покоя (нативного состояния) в активированное (ненативное) состояние.

Принципы нативной агрегации

С точки зрения предлагаемого подхода, реакции клетки на внешние воздействия, различные формы клеточной активности (метаболизм, деление, мышечное сокращение, секреция, внутриклеточная сигнализация и прочее), а также патологические состояния рассматриваются на основе следующих утверждений и принципов.

Нативная агрегация — это специфическое взаимодействие белков друг с другом, осуществляемое посредством взаимодействия между вторичными структурами агрегирующих белков. Если реакционноспособных вторичных структур нет или они недоступны для взаимодействия, нативная агрегация невозможна.

Клетка рассматривается в качестве системы, у которой может быть только два основных состояния: состояние покоя и активное (возбужденное) состояние. Этот же принцип распространяется на любую клеточную органеллу, структуру, белковую молекулу. Для ясности, можно провести параллель: возбудимая мембрана в состоянии покоя и возбуждения.

Функционально значимые белки клетки в состоянии покоя находятся в одном из двух состояний: либо развернуты (полностью или частично — нативно-развернутые белки), либо свернуты до состояния белковой глобулы или иной структуры, когда вторичные структуры недоступны для взаимодействия с другими белками. Эти состояния рассматриваются как состояния покоя белковой молекулы или как их нативные состояния. Белки в нативном состоянии стабилизируются лигандами покоя и/или химическими модификациями, например фосфорилированием/дефосфорилированием. Согласно Лингу (Ling, 1977), состояние покоя развернутого белка поддерживается связанными с ним АТФ, ионами (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}),

молекулами связанной воды, гормонами (например, инсулином) и любыми другими значимыми взаимодействиями. Например, анализ аминокислотных последовательностей участков, окружающих известные центры фосфорилирования показали их выраженную склонность к формированию нативно-развернутой конформации (Iakoucheva et al., 2004). Разрушение связи с лигандом (например, расщепление АТФ) приводит к активации белка, его переходу из состояния покоя в активное состояние; к этому же результату приведет снижение уровня АТФ в клетке ниже критического уровня. Представления Линга о способности небольших молекул специфично связываться с нативно-развернутыми белками находит подтверждение, например, в работе Мухопадхья и др. (Mukhopadhyay et al., 2007).

При активации клетки внешними воздействиями, внутриклеточными факторами и сигналами различной природы (включая химическую модификацию) в ней появляется новая фракция белков – активированных белков с вновь образованными вторичными структурами, которых не было в состоянии покоя (рис. 2). Эти новые структуры появляются при сворачивании нативно-развернутых белков и при плавлении белковых глобул. Эти структуры представляют собой α -спирали, β -листы, другие разновидности вторичных структур. Вторичные структуры активированных белков — это новые «валентности», необходимые для новых взаимодействий, внутримолекулярных (сворачивание) и межмолекулярных (нативная агрегация). В случае больших белков, вторичные структуры могут формировать гидрофобные области на поверхности белка, которые специфично взаимодействуют с такими же (комплементарными) образованиями на поверхности других белков.

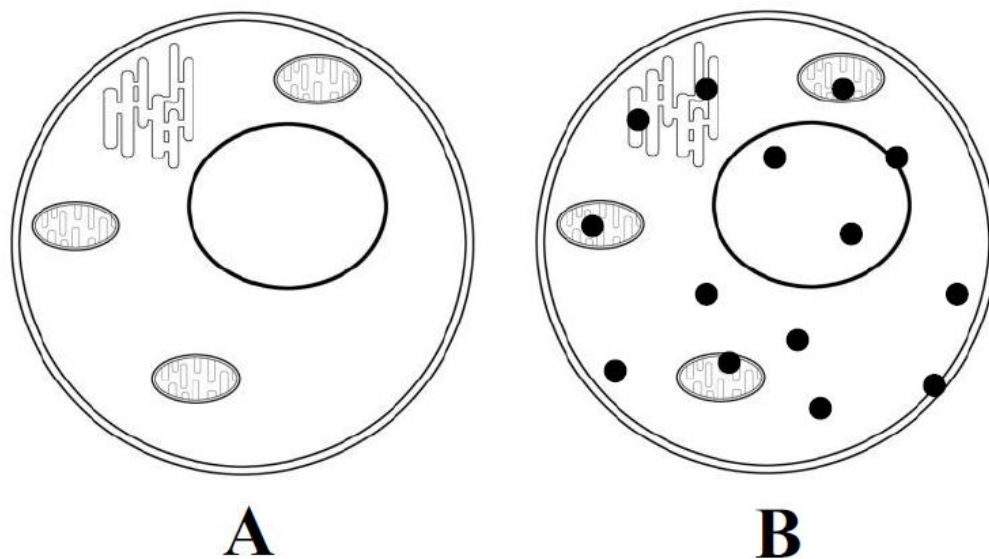


Рис. 2. Два основных состояния клетки. А — клетка в состоянии покоя, оптически прозрачна. В — активированная клетка; в цитоплазме и клеточных органеллах появляются центры нативной агрегации (черные кружки) — реакционноспособные вторичные структуры активированных белков, благодаря которым начинается нативная агрегация белков клетки.

Нативно-развернутые белки можно назвать возбудимыми белками. Переход их в возбужденное состояние дает толчок нативной агрегации.

Если при развертывании глобулы (или глобулярного домена) расплавленной глобулы не образуется, а белок кооперативно приобретает полноразвернутую конформацию, то это означает его инактивацию, поскольку без вторичных структур белок к агрегации неспособен. Расплавленная глобула инактивируется двумя путями: переходом обратно в хорошо свернутую конформацию (когда вторичные структуры скрыты от взаимодействия) или

развертыванием расплавленной глобулы до состояния полноразвернутой конформации, лишенной ключевых для нативной агрегации вторичных структур.

Вторичные структуры в активированных белках играют роль центров нативной агрегации. Именно эти структуры обеспечивают специфическое взаимодействие активированных белков друг с другом (нативная агрегация) с образованием новых структур, имеющих сигнальное и функциональное значение для активной клетки. Нативная агрегация детерминирована теми же силами и взаимодействиями, что и хорошо изученное сворачивание развернутого полипептида в глобулу. Должно соблюдаться правило: есть вторичные структуры, способные к специфическим взаимодействиям, — есть нативная агрегация, нет таких структур или они недоступны — нет нативной агрегации.

Если при воздействии на белок в нем увеличивается количество аминокислотных остатков, включенных во вторичные структуры, это означает, что белок активирован, а сигнальный путь, в работе которого он принимает участие — открыт. Если белок разворачивается и доля аминокислотных остатков во вторичных структурах снижается, то такой белок переходит в неактивное состояние, релаксирует, а сигнальный путь (пути) в котором он участвует, блокируется. При переходе белков, участвовавших в нативной агрегации, в нативное состояние, нативные агрегаты разрушаются, отдельные структуры и клетка в целом переходят в состояние покоя.

Временные структуры, возникающие в результате нативной агрегации, выполняют разнообразные функции. Они могут быть центрами специфической адсорбции (связывания) различных ионов и молекул, включая сигнальные факторы и белки, то есть выполнять функции рецепторов. Они могут обладать ферментативной активностью, которая необходима для выполнения той или иной функции и служить центрами формирования еще более сложных надмолекулярных образований.

Только вторичные структуры белков способны обеспечить специфичность (избирательность, селективность) взаимодействия одних белков с другими, как они обеспечивают специфичность взаимодействий, необходимых для правильного сворачивания полипептидной цепи в глобулу (сворачивание полипептида в нативную глобулу можно рассматривать как внутримолекулярную нативную агрегацию). Каждая вторичная структура имеет уникальную топологию полярных и гидрофобных групп на своей поверхности. Вторичные структуры образуют стабильные комплексы друг с другом или с участками нуклеиновых кислот только в том случае, если их поверхности комплементарны друг другу как ключ комплементарен замку.

Нативная агрегация детерминирована генетически в той же мере, что и структура белка потому, что ее определяют те же факторы, которые определяют все уровни организации отдельной белковой молекулы, начиная с первичной последовательности. Вторичные структуры активированных (возбужденных) белков будут взаимодействовать с другими возбужденными белками не хаотически, а в соответствии с генетической программой. В результате нативной агрегации возникнут те структуры, и соответствующие функции, которые необходимы клетке здесь и сейчас: потенциал действия, каналы на поверхности клетки, в цитоплазме и ядре, цитоскелет, движение участков цитоплазмы, деление клетки, апоптоз. Ошибки в нативной агрегации, появляющиеся при затянувшемся состоянии возбуждения клетки (например, при хронических воспалениях) и при повреждении приводят к различным формам клеточной патологии: конформационным болезням, некрозу, раковому перерождению.

Всё, чем отличается возбужденная клетка от клетки в состоянии покоя, является прямым или косвенным результатом нативной агрегации белков.

Нативная агрегация в действии

Поскольку практически любое изменение в клетке можно рассматривать как результат нативной агрегации, ограничусь лишь отдельными примерами. Цель этого раздела показать, как работают принципы нативной агрегации при анализе конкретных явлений.

Начну с нативно-развернутых белков, физической основы состояния покоя. Согласно Данкеру и др. (Dunker et al., 2001), первые данные о нативно-развернутых участках в белках появились в 1978 году, то есть через 26 лет после того, как Линг (Ling, 1952) высказал предположение об их существовании. До открытия нативно-развернутых белков господствовало представление, что всё разнообразие функций клетки обусловлено только белками с трехмерной (глобулярной) структурой. Нативно-развернутые белки в эти представления не укладывались, и было непонятно, выполняют ли они вообще какие-либо функции. Позднее выяснилось, что более 35-51% белков эукариот имеют развернутые участки длиннее 50 аминокислотных последовательностей, что заметно больше, чем у прокариот (Dunker et al., 2000, 2002).

Когда стало ясно, что нативно-развернутые белки играют какую-то важную роль, Данкер и др. (Dunker et al., 2001) предложили расширить представление о типах белков, функционирующих в клетке: к белкам с трехмерной структурой они добавили расплавленную глобулу и белки с развернутой конформацией. Уверский (Uversky, 2002) считает, что этот список нужно дополнить четвертой относительно устойчивой конформацией белка — предрасплавленной глобулой, которую можно было бы назвать кипящей глобулой потому, что в координатах реакции развертывания она стоит после глобулы и расплавленной глобулы и перед полностью развернутой конформацией. Логика этих предложений состоит в том, что все четыре состояния белка являются термодинамически устойчивыми, хотя и в разной степени.

По мысли Данкера и др., в клетке постоянно происходят переходы между разными фазовыми состояниями белка. Это действительно так, но такое утверждение требует существенного уточнения. Вспомним, что первые представления о расплавленной глобуле и развернутой конформации белка были получены при исследовании денатурации белка *in vitro* и затем их перенесли на клетку. Теперь мы знаем, что плавление глобулы — это фазовый переход, подчиняющийся закону «все или ничего» и имеющий порог, например, температурный (Финкельштейн и Птицын, 2005). Это означает, что несколько одинаковых белковых молекул, находящихся в одинаковых условиях будут находиться в одном и том же фазовом состоянии: либо это будет глобула, либо расплавленная глобула, либо развернутая конформация. Непрерывного и асинхронного перехода белков внутри такой популяции из одного фазового состояния в другое происходить не может. Но молекулы того же белка, находящиеся в другом микроокружении, могут находиться в другом фазовом состоянии, но тоже одинаковом для всех белков данной популяции. В итоге мы получаем, что данный белок действительно может находиться в данной клетке в *разных* фазовых состояниях, но только если его молекулы находятся в *разных* частях клетки с разными условиями микроокружения.

Необходимо сделать и другое уточнение. Согласно гипотезе нативной агрегации, имеется только два базовых состояния белка, которые имеют место в клетке в состоянии покоя: глобула (сюда можно отнести также белки, состоящие из двух и более глобулярных доменов) и нативно-развернутое состояние. Остальные переходные состояния появляются в клетке на время. Они возникают при достижении порога, когда какой-либо фактор среды начинает оказывать на белок умеренно денатурирующее действие. Тогда глобулярный белок плавится, а затем разворачивается (если сила воздействия продолжает расти), а нативно-развернутый белок начинает сворачиваться. Различия между двумя основными состояниями существенные: глобулярная конформация стабилизируется гидрофобными взаимодействиями, а нативно-развернутая — АТФ и другими лигандами. Как только условия среды приходят в норму, возбужденные белки релаксируют и система возвращается в свое основное состояние — состояние покоя.

Поскольку в результате нативной агрегации возникают сигнальные и регуляторные структуры, очевидно, что с эволюционным усложнением биологической организации требуются все новые и новые механизмы регуляции активной клетки. Именно эта потребность и реализуется с помощью новых нативно-развернутых белков и, соответственно, новых переходных конформаций, возникающих при их свертывании.

В литературе широко обсуждается механизм взаимодействия нативно-развернутых белков с белками-мишенями. Чаще всего выделяют четыре этапа такого взаимодействия: (1) случайное столкновение нативно-развернутого белка с мишенью; (2) слабое, неспецифическое взаимодействие нативно-развернутого белка с мишенью; (3) формирование у нативно-развернутого белка вторичных структур; (4) благодаря появившимся вторичным структурам образуется прочный комплекс нативно-развернутого белка с белком-мишенью (Eliezer and Palmer, 2007; Wright and Dyson, 2009).

С позиций гипотезы нативной агрегации, эта схема выглядит неубедительно. Действительно, трудно представить себе какой-либо механизм (например, механизм мышечного сокращения) или процесс в живой клетке, работающий на основе случайных столкновений. Во-первых, если нативно-развернутые белки и их мишени сталкиваются случайно, значит, они свободно диффундируют в цитоплазме или ядре, то есть мы имеем дело с броуновским механизмом регуляции. Во-вторых, если первый этап взаимодействия нативно-развернутого белка с мишенью признать неспецифическим, то это означает, что количество взаимодействий, в которые будет вступать диффундирующий нативно-развернутый белок, значительно превысит количество взаимодействий, необходимых для акта регуляции. При таких условиях, правильный регуляторный ответ выглядит скорее случайностью, чем закономерностью.

С точки зрения нативной агрегации, эти события выглядят иначе. Имеющиеся экспериментальные данные свидетельствуют о том, что нативно-развернутые белки организованы в кластеры и ориентированы в пространстве в основном параллельно друг другу (Линг, 2008, гл. 11), а концентрация белка в цитоплазме достигает 200-400 мг/мл (Ellis, 2001). Таким образом, в условиях кроудинга, когда пространство между белковыми молекулами невелико и заполнено связанной водой (Линг, 2008, гл. 11), представить себе диффузию свободных белков весьма затруднительно. По Лингу, белковый матрикс покоящейся клетки не хаотичен, а структурирован. В свете гипотезы нативной агрегации это означает, что в пространственном распределении ключевых элементов матрикса заложена программа белок-белковых взаимодействий (как, например, в сократительном аппарате). Нативно-развернутый белок не диффундирует в ожидании случайного попадания в мишень. Мишень относительно неподвижна и находится рядом. В состоянии покоя они не взаимодействуют друг с другом, поскольку находятся в неактивном (нативном) состоянии, то есть не имеют реакционноспособных вторичных структур.

Если вторичные структуры в нативно-развернутых белках будут образовываться при всяком столкновении с другими белками, то само появление вторичных структур тоже станет событием случайным и их взаимодействие друг с другом не будет поддаваться никакой логике. По этой причине случайные, неспецифические, взаимодействия должны быть исключены из механизма функционирования нативно-развернутых белков. Для того чтобы случайные взаимодействия не приводили нативно-развернутые белки в возбужденное состояние, они должны быть достаточно стабильными. Согласно предлагаемому подходу, нативно-развернутые белки стабилизируются различными лигандами, в зависимости от свойств нативно-развернутого белка, его локализации и функции (Ling, 2006).

Четвертый этап взаимодействия с мишенью также проблематичен потому, что *активированный* нативно-развернутый белок будет взаимодействовать, с моей точки зрения, только с *активированным* белком-мишенью (с его активными вторичными структурами). Нативные глобулярные белки (или глобулярные домены в больших белках) в нативном состоянии не имеют вторичных структур, доступных для внешних взаимодействий. Этому

препятствует жесткая структура ядра таких белков (Финкельштейн и Птицын, 2005, лекция 13).

Итак, мы видим, что гипотеза нативной агрегации отличается от принятой в литературе модели тем, что в ней нет ничего случайного и неспецифического. Более того, в нее включены элементы контроля и управления: генетический контроль первичной последовательности (а, следовательно, и свойств вторичных структур), лиганды, высоко-специфические взаимодействия вторичных структур друг с другом, пространственный контроль над ходом нативной агрегации.

Что касается пространственного контроля, то он также обеспечивается, прежде всего, взаимодействием «остаточных» вторичных структур соседних нативно-развернутых белков (с точки зрения предлагаемого подхода). Такое предположение вполне обосновано, если учесть, что полное отсутствие вторичных структур возможно лишь в самых жестких денатурирующих условиях (Финкельштейн и Птицын, 2005, лекция 17). Если принять во внимание специфическую коммутационную роль «остаточных» вторичных структур, то и пространственное строение белкового матрикса *в состоянии покоя* также оказывается под генетическим контролем, поскольку свойства «остаточных» вторичных структур закодированы первичной последовательностью аминокислотных остатков.

Теперь рассмотрим подробнее свойства расплавленной глобулы. Упаковка полипептидной цепи в невозмущенной глобуле настолько плотная, что боковые группы плотно прилегают друг к другу и их вращение вокруг валентных связей (поворотная изомеризация) оказывается невозможным. При плавлении ядра объем глобулы увеличивается примерно на 50% (Uversky, 2002), появляется свободный объем, а вместе с ним становится возможной и поворотная изомеризация. В результате разрыхления ядра в него начинают проникать вода и гидрофобные вещества, такие, например, как краситель ANS. Если интенсивность денатурирующего фактора возрастает, расплавленная глобула превращается в предрасплавленную глобулу, в которой количество вторичных структур примерно вдвое меньше, чем в расплавленной (Финкельштейн и Птицын, 2005, лекция 18).

Указанные свойства расплавленной глобулы (не говоря уже о предрасплавленной) говорят о том, что ее ядро утрачивает жесткость и больше напоминает жидкость. Увеличение конформационной температуры неизбежно приводит к увеличению подвижности частей молекулы, к снижению доли полипептидной цепи, включенной во вторичные структуры. Модификация вторичных структур неизбежно приводит к изменению их специфичности, так как изменяются их топологические характеристики. Иначе говоря, изменение размера вторичной структуры (например, длины α -спирали) означает изменение биологического смысла полипептидного «предложения». Логика приведенного рассуждения находит экспериментальное подтверждение в работах, свидетельствующих о структурной лабильности ядра расплавленной глобулы (Lala and Kaul, 1992). Таким образом, расплавленная глобула превращается в реакционноспособный белок, способный участвовать в нативной агрегации.

Рассмотрим далее некоторые данные, свидетельствующие о вовлеченности вторичных структур белка в механизм передачи сигналов. Ким и др. (Kim et al., 2002) исследовали динамику цитоплазматических доменов рецептора хемотаксиса *E. coli* при взаимодействии с репеллентом и аттрактантом. Авторы пришли к выводу, что аттрактант снижает количество вторичных структур в домене, что блокирует передачу сигнала в цитоплазму. Репеллент оказывает противоположное действие: увеличивает количество вторичных структур в домене, что делает возможной сигнальную функцию рецептора. В терминах гипотезы нативной агрегации, репеллент переводит домен в возбужденное состояние, когда у него появляются «валентности» для взаимодействий, необходимых для передачи сигнала. Авторы также полагают, что метилирование/деметиличивание рецепторов потому столь важны для их кластеризации и диссоциации образовавшихся кластеров, что вызывает значительные изменения в количестве вторичных структур в доменах.

Уильямс и др. (Williams et al., 2004) отмечают, что упорядоченность полипептидной цепи тесно связана с функциями белков. Так, например, связывание лигандов со стрептавидином, пурин-нуклеозидфосфорилазой (purine nucleoside phosphorylase), гипоксантингуанин-фосфорибозилтрансферазой (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase), гемоглобином и миоглобином приводит к некоторому разупорядочиванию белковых молекул. Авторы провели термодинамический анализ влияния на рецепторы соответствующих агонистов и антагонистов и пришли к заключению, что механизм действия этих лигандов связан с противоположными эффектами на упорядоченность структуры рецепторов: более плотная упаковка полипептидной цепи внутри белка приводит к усилению степени олигомеризации рецепторов, менее плотная упаковка — снижает степень олигомеризации. Интересно, что агонисты вызывают противоположные структурные изменения в разных рецепторах: агонист одного рецептора улучшает укладку полипептидной цепи, агонист другого рецептора ухудшает ее (это справедливо и для антагонистов). Физиологический смысл этих изменений будет понятен только тогда, когда станет ясно, частью какого механизма эти изменения является. Рецепторы — это еще одна система, для которой существование двух состояний — покоя и активированного — представляется очевидным. В этом смысле клетку можно рассматривать как мегарецептор: переключение из одного состояния в другое порождает сложный сигнал соседним клеткам.

Согласно современным представлениям, шапероны играют важную роль в жизни клетки. Интересен пример малых белков теплового шока, разнообразный класс шаперонов, широко распространенный в клетках различных типов. Часть представителей этого семейства неактивны в клетке в состоянии покоя и активируются, например, при увеличении температуры (Haslbeck et al., 2005). Согласно логике нативной агрегации, триггерное действие температуры должно приводить не только к появлению ненативных форм белка, но и активировать сами белки теплового шока. Для этого им необходимо либо иметь нативно-развернутые участки полипептидной цепи, либо они должны обладать способностью переходить в состояние расплавленной глобулы. Это приведет к формированию центров нативной агрегации, а затем и к самой агрегации. Начнется нативная агрегация *активированного* шаперона с *активированной* мишенью.

В литературе признается, что наличие в молекулах шаперонов нативно-развернутых участков необходимо для их работы (Weikl et al., 1999; Richardson et al., 2001; Tompa and Csermely, 2004). С точки зрения нативной агрегации, эти развернутые участки нужны для формирования вторичных структур, необходимых для нативной агрегации с мишенью. Но и сама мишень должна представлять собой возбужденный белок, которым может стать либо нативно-развернутый белок (или нативно-развернутый участок белка), либо глобула, ставшая расплавленной глобулой. Это предположение подтверждается результатом исследований Хедьи и Томпы (Hegyí and Tompa, 2008), показавших, что нативно-развернутые белки не обнаруживают тенденции к взаимодействию с шаперонами. Этот результат понятен. Нативно-развернутые белки — это нативные белки, белки в состоянии покоя. Для того чтобы они стали взаимодействовать с другими белками, в том числе с шаперонами, их нужно активировать — перевести в возбужденное, денатурированное, состояние. С другой стороны, способность шаперонов взаимодействовать с расплавленными глобулами, известна давно (Rawat and Rao, 1998).

С точки зрения предлагаемого подхода, результатом нативной агрегации являются новые структуры, необходимые возбужденной клетке. Формирование таких структур — процесс кооперативный, т.е. требующий участия двух и более белков. Без такой кооперации новую структуру не создать. При таком понимании нативной агрегации становится очевидным, что каждый из двух и более белков, вступая во взаимодействие друг с другом, помогает белку-партнеру правильно сворачиваться. Иначе говоря, все белки, участвующие в нативной агрегации, являются друг для друга шаперонами, но часть из них могла пройти более глубокую специализацию в этом направлении.

Хорошо известно, что для освобождения белков-мишеней некоторым шаперонам необходима АТФ (Haslbeck et al., 2005). Этот факт хорошо объясняется с позиций представлений Линга: связывание АТФ приводит к разборке вторичных структур, образовавшихся на нативно-развернутом участке молекулы шаперона, осуществлявших связывание с белком-мишенью. В результате, комплекс шаперона с мишенью распадается. Для других шаперонов роль АТФ могут играть другие лиганды.

Нативная агрегация, как и любой другой процесс в клетке, может быть объектом регуляции. Различные факторы могут вмешиваться в ее ход, порождая новые и новые сигнальные структуры. В качестве примера можно привести программируемую клеточную смерть. Механизм генетической регуляции апоптоза может быть источником сигнала, который приведет к тому, что в результате нативной агрегации возникнет структура, которая запустит весь каскад реакций, необходимых для деградациии клетки. С точки зрения нативной агрегации, такая структура может возникнуть в любой части клетки — в ядре, цитоплазме, органеллах, плазматической мембране. «Структура смерти», порожденная нативной агрегацией, может возникнуть и при повреждении клетки (или ее частей). По такому же механизму могут возникать любые другие патологии клетки, например, рак.

Из особенностей раковой клетки отмечу то, что непосредственно относится к теме настоящей статьи. Известно, что содержание связанной воды в раковых клетки меньше, чем в клетках-предшественниках (Chaplin, 2006). Именно на этом различии основана технология магнитно-резонансной томографии, позволяющая неинвазивно распознавать раковые опухоли. С точки зрения Линга, это означает, что нативно-развернутых белков в раковой клетке меньше, чем в нормальной. В то же время *in silicio* показано, что количество нативно-развернутых участков больше в белках раковых клеток: в белках, ассоциированных с раковой трансформацией, таких участков больше на 70%, а у сигнальных белков — их в 5 раз больше (Iakoucheva et al., 2002). Очевидно, что нативно-развернутые белки представляют собой разнородную популяцию и непосредственно вовлечены в трансформации клеток патологического характера.

Динамика гидрофобной фазы живой клетки

Как я уже говорил, клетка в состоянии покоя является гидрофильной системой. Об этом свидетельствуют данные по распределению гидрофобных веществ (витальных красителей) между клеткой и средой *в условиях диффузионного равновесия*: в состоянии покоя клетка такие вещества не поглощает (Насонов, 1962).

Здесь я хотел бы обратить внимание читателя на очень важное обстоятельство: в условиях диффузионного равновесия плазматическая мембрана перестает работать как барьер на пути диффундирующего вещества. Абсолютно непроницаемых мембран нет, особенно для гидрофобных веществ. Краситель, несомненно, проникает в покоящуюся клетку, но не накапливается в ней. Почему? Причины две: в клетке отсутствуют гидрофобные центры связывания для красителей, а внутриклеточная вода является для них плохим растворителем. По этим причинам молекулы красителей, проникших в клетку, в конечном счете, выталкиваются из клетки в среду. Таким образом, в условиях диффузионного равновесия характер распределения вещества между клеткой и средой определяется только двумя факторами: сорбцией на внутриклеточных структурах и плохой растворяющей способностью внутриклеточной воды (Troshin, 1966; Ch. 5).

Все меняется, когда клетка переходит в возбужденное состояние: связывание витальных красителей в условиях диффузионного равновесия возрастает на десятки и сотни процентов (Насонов, 1962). Этому может быть только одно объяснение: в клетке взрывообразно нарастает объем гидрофобной фазы (Matveev, 2005).

Гидрофобная фаза привычно ассоциируется с липидной фазой мембран, но объем липидной фазы ничтожно мал по сравнению с размером клетки и, самое главное, — он не

может за доли секунды возрасти в десятки раз. Однако, как мы уже знаем, в возбужденной клетке белки претерпевают денатурационные изменения (Насонов, 1962). Следовательно, причину увеличения гидрофобности клетки следует искать в белках, а не в липидах (Matveev, 2005).

Гипотеза нативной агрегации дает простое объяснение гидрофобному взрыву в клетке: причиной роста гидрофобной фазы является появление в клетке возбужденных белков. Действительно, при превышении порога возмущающего действия на нативно-развернутые белки, в них, согласно предлагаемому подходу, начинают формироваться вторичные структуры, а затем эти вторичные структуры, в ходе нативной агрегации, включаются в гидрофобные области новых структур — структур возбуждения. Как я уже говорил, гидрофобные области формируются не только расплавленными глобулами, но и вторичными структурами, возникающими при сворачивании развернутых участков белков.

Высокая скорость образования вторичных структур, укладываемая в микросекундный диапазон времени (Финкельштейн и Птицын, 2005; лекция 9), определяет и высокую скорость нативной агрегации в целом, что и позволяет говорить о гидрофобном взрыве в возбужденной клетке. При обратном переходе в состояние покоя, клетка вновь становится гидрофильной. Согласно гипотезе нативной агрегации, значительные изменения гидрофобной фазы могут иметь место в любой клеточной структуре, включая мембраны и органеллы.

Предположение о существовании временных гидрофобных фаз белков объясняет интересные явления, известные из фармакологии, когда эффективность лекарственного препарата зависит от степени функциональной активности клетки-мишени. Самым известным примером такого рода является, вероятно, верапамил. Это гидрофобное (Kasim et al., 2004) соединение практически не влияет на обычный ритм сердечных сокращений, но с высокой эффективностью подавляет учащенное сердцебиение. Такая же закономерность наблюдается и при действии верапамила на скелетные мышцы. Эту зависимость можно объяснить тем, что при возбуждении в мышечном волокне возникают гидрофобные рецепторы, связывающие верапамил. Эффект верапамила объясняется его блокирующим действием на медленные кальциевые каналы, но с точки зрения принципов нативной агрегации, в клетке могут быть и другие динамичные гидрофобные мишени для фармакологических агентов разных типов. Иначе говоря, исходя из принципов нативной агрегации, можно предсказать существование лекарств, которые действуют только на активную клетку, причем их мишени могут находиться не только в мембране (как в случае с верапамилем), но и в других частях клетки. На клетку в состоянии покоя (здоровую клетку) такие лекарства не будут оказывать заметного влияния.

Роль динамичной гидрофобной фазы белков в жизни клетки совершенно не изучена. Она является неизвестным в уравнении клеточной физиологии. Сейчас о значении этого X-фактора можно говорить, прибегая лишь к самым общим закономерностям, основанным на простых физических принципах. Например, очевидно, что появление в клетке гидрофобной фазы вызовет перераспределение в клетке *всех* гидрофобных соединений, включая АТФ (Matveev, 2005). Начнется перераспределение гидрофобных веществ и между клеткой и средой.

Однако толчок к перераспределению веществ даст не только появление временной гидрофобной фазы, но и десорбция воды с поверхности белков. С началом формирования вторичных структур адсорбированная вода станет свободной, и «плохой» растворитель станет «хорошим». Это приведет к быстрому вторжению небольших молекул растворенных веществ в области, которые ранее занимала адсорбированная вода. Если принять во внимание большую скорость формирования вторичных структур (Финкельштейн и Птицын, 2005; лекция 9), то становится очевидным, что при быстром разрушении упорядоченной структуры воды возникнут резкие градиенты концентраций таких веществ. В случае ионов, повсюду в клетке, в микрообъемах, будут возникать значительные диффузионные потенциалы, которые могут оказаться одной из причин появления расплавленных глобул.

Значительные концентрационные градиенты растворенных веществ могут возникать и при восстановлении упорядоченных слоев воды, так как скорость их восстановления также будет определяться высокой скоростью разборки вторичных структур активированных белков.

Очевидно, что в ходе нативной агрегации плотность и жесткость белкового матрикса будет возрастать из-за увеличения числа межбелковых контактов. Это создает еще больше трудностей для тех моделей регуляции клеточных функций, которые строят свои механизмы на свободной диффузии веществ в клетке, так как с ростом плотности белкового матрикса значение диффузионных процессов будет снижаться.

Если вернуться к протореакции клетки, то можно уверенно заключить, что гипотезе нативной агрегации удастся дать объяснение увеличению вязкости и мутности цитоплазмы (рис.1), а также увеличению объема гидрофобной фазы клетки. Причем, из предложенного механизма ясно, что указанные изменения будут происходить синхронно потому, что ключевым звеном всех этих изменений является структурная перестройка одних и тех же ключевых белков.

Заключение

Краеугольным камнем гипотезы нативной агрегации является генерация в белках временных вторичных структур, способных избирательно взаимодействовать с другими вторичными структурами того же белка или других белков. Неспецифическая реакция клеток, исследованная школой Насонова, оказывается в действительности наполненной мириадами специфических белок-белковых взаимодействий. Поскольку нативная агрегация направляется активными вторичными структурами белков, она оказывается под полным генетическим контролем, а догму Anfinsen (Anfinsen, 1973), сформулированную для сворачивающейся полипептидной цепи, можно расширить, включив в сферу ее применимости и нативную агрегацию.

Благодарности. Выражаю свою признательность Paul Agutter, James Clegg, Пиа Digel, Laurent Jaeken, José Neira и Richard Wiggins за критические замечания к рукописи. Я благодарен Леониду Залмановичу Певзнеру за перевод статьи на английский язык.

Литература

Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 1973;181(96):223-230.

Baló-Banga JM, Molnár L, Nováki M, Leibinger J. Measurement of lymphocyte activation by a chromatin topo-optical reaction. II. Application for detecting drug allergy. A clinical and experimental study. *Allerg Immunol (Leipz)*. 1980a;26(2):137-153.

Baló-Banga JM, Molnár L, Nováki M, Leibinger J. Measurement of lymphocyte activation by a chromatin topo-optical reaction. Mechanism and specificity of the test. *Arch Dermatol Res*. 1980b;269(3):239-251.

<http://www.bioparadigma.spb.ru/files/Balo-Banga-1980-Measurement.of.Lymphocyte.Activation.pdf>

Bearden J Jr, Bendet IJ. Birefringence of spermatozoa. I. Birefringence melting of squid, bull, and human sperm nucleoprotein. *J Cell Biol*. 1972;55(2):489-500.

Chaplin M. Do we underestimate the importance of water in cell biology? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(11):861-866.

Collins JM, Leadbeater NE. Microwave energy: a versatile tool for the biosciences. *Org Biomol Chem.* 2007;5(8):1141-50.
<http://www.bioparadigma.spb.ru/files/Collins-2007-Microwave.energy.pdf>

Dunker AK, Obradovic Z, Romero P, Garner EC, Brown CJ. Intrinsic protein disorder in complete genomes. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform.* 2000;11:161-171.

Dunker AK, Lawson JD, Brown CJ, Williams RM, Romero P, Oh JS, Oldfield CJ, Campen AM, Ratliff CM, Hipps KW, Ausio J, Nissen MS, Reeves R, Kang C, Kissinger CR, Bailey RW, Griswold MD, Chiu W, Garner EC, Obradovic Z. Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model.* 2001;19(1):26-59.

Dunker AK, Brown CJ, Lawson JD, Iakoucheva LM, Obradovic Z. Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry.* 2002;41(21):6573-6582.

Eliezer D, Palmer AG 3rd. Proteins hunt and gather. *Nature.* 2007;447(7147):920-921.

Ellis RJ. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(10):597-604.

Fulton AB. How crowded is the cytoplasm? *Cell.* 1982;30(2):345-347.

Haslbeck M, Franzmann T, Weinfurter D, Buchner J. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12(10):842-846.

Hegyí H, Tompa P. Intrinsically disordered proteins display no preference for chaperone binding in vivo. *PLoS Comput Biol.* 2008;4(3):e1000017.
<http://www.bioparadigma.spb.ru/files/Hegyí-2008-Intrinsically.Disordered.Proteins.pdf>

Heuser J. Whatever happened to the 'microtrabecular concept'? *Biol Cell.* 2002;94(9):561-596.
Iakoucheva LM, Brown CJ, Lawson JD, Obradovic Z, Dunker AK. Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins. *J Mol Biol.* 2002;323(3):573-584.

Iakoucheva LM, Radivojac P, Brown CJ, O'Connor TR, Sikes JG, Obradovic Z, Dunker AK. The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(3):1037-1049.

Inners D, Bendet IJ. Thermal stability of T2 DNA in situ. *Virology.* 1969;38(2):269-277.

Kasim NA, Whitehouse M, Ramachandran C, Bermejo M, Lennernäs H, Hussain AS, Junginger HE, Stavchansky SA, Midha KK, Shah VP, Amidon GL. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Mol Pharm.* 2004;1(1):85-96.

Kemp DD, Gordon MS. An interpretation of the enhancement of the water dipole moment due to the presence of other water molecules. *J Phys Chem A.* 2008;112(22):4885-4894.
<http://www.bioparadigma.spb.ru/files/Kemp-2008-An.Interpretation.of.the.Enhancement.pdf>

Kim SH, Wang W, Kim KK. Dynamic and clustering model of bacterial chemotaxis receptors: structural basis for signaling and high sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(18):11611-11615.

Lala AK, Kaul P. Increased exposure of hydrophobic surface in molten globule state of alpha-lactalbumin. Fluorescence and hydrophobic photolabeling studies. J Biol Chem. 1992;267(28):19914-19918.

Ling GN. The role of phosphate in the maintenance of the resting potential and selective ionic accumulation in frog muscle cells. In: Phosphorus metabolism vol. II. (eds. McElroy WD, Glass B). Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1952, p.748–795.

Ling GN. A Physical Theory of the Living State: The Association-Induction Hypothesis. Waltham MA: Blaisdell, 1962.

Ling GN. The physical state of water in living cell and model systems. Ann NY Acad Sci 1965;125(2):401-417.

<http://www.bioparadigma.spb.ru/files/Ling-1965-The.physical.state.of.water.pdf>

Ling GN. The physical state of water and ions in living cells and a new theory of the energization of biological work performance by ATP. Mol Cell Biochem. 1977;15(3):159-172.

Ling GN. In Search of the Physical Basis of Life. New York: Plenum Publ Corp, 1984.

Ling GN. A Revolution in the Physiology of the Living Cell. Malabar FL: Krieger Publ Co, 1992.

<http://www.bioparadigma.spb.ru/files/Ling-1992-Revolution-FullText-PlusFreeDjVuViewer.rar>

Ling GN. Life at the Cell and Below-Cell Level: the Hidden History of a Fundamental Revolution in Biology. New York: Pacific Press, 2001. *Имеется русский перевод этой книги:*

<http://www.bioparadigma.spb.ru/russianling/russianling.htm>

Ling GN. A convergence of experimental and theoretical breakthroughs affirms the PM theory of dynamically structured cell water at the theory's 40th birthday. In: Water and the Cell (Pollack, G.H., Cameron, I. L. and Wheatley, D.N., eds.). Springer Verlag, Berlin, New York, 2006; p. 1-52.

http://www.bioparadigma.spb.ru/files/Ling_2006_Convergence.of.experimental.and.theoretical.breakthroughs.djvu

Ling GN. Nano-protoplasm: the ultimate unit of life. Physiol Chem Phys Med NMR. 2007;39(2):111-234.

<http://www.bioparadigma.spb.ru/files/Ling-2007-Nano-protoplasm.pdf>

Полезное дополнение к этой статье: Ling GN, Ochsenfeld MM. A historically significant study that at once disproves the membrane (pump) theory and confirms that nano-protoplasm is the ultimate physical basis of life--yet so simple and low-cost that it could easily be repeated in many high school biology classrooms worldwide. Physiol Chem Phys Med NMR. 2008;40:89-113.

<http://www.bioparadigma.spb.ru/files/Ling-2008-A.Historically.Significant.Study.pdf>

Matveev VV. Protoreaction of protoplasm. Cell Mol Biol 2005;51(8):715-723.

<http://www.bioparadigma.spb.ru/files/Matveev-2005-Protoreaction.of.protoplasm.pdf>

Mirsky AE. Protein coagulation as a result of fertilization. Science. 1936a;84(2180):333-334.

Mirsky AE. The Visual Cycle and Protein Denaturation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1936b;22(2):147-149.

<http://www.bioparadigma.spb.ru/files/Mirsky-1936-The.visual.cycle.and.protein.denaturation.pdf>

Mirsky AE, Pauling L. On the Structure of Native, Denatured, and Coagulated Proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1936;22(7):439-447.

Mukhopadhyay S, Krishnan R, Lemke EA, Lindquist S, Deniz AA. A natively unfolded yeast prion monomer adopts an ensemble of collapsed and rapidly fluctuating structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(8):2649-2654.

Porter KR. The cytomatrix: a short history of its study. *J Cell Biol*. 1984;99(1 Pt 2):3s-12s.
<http://www.bioparadigma.spb.ru/files/Porter-1984-The.cytomatrix.pdf>

Porter KR, Tucker JB. The ground substance of the living cell. *Sci Am*. 1981;244(3):56-67.

Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* 2003;283(1):1-16.
<http://www.bioparadigma.spb.ru/files/Proskuryakov-2003-Necrosis.pdf>

Rawat U, Rao M. Interactions of chaperone alpha-crystallin with the molten globule state of xylose reductase. Implications for reconstitution of the active enzyme. *J Biol Chem*. 1998;273(16):9415-23.

Richardson A, Schwager F, Landry SJ, Georgopoulos C. The importance of a mobile loop in regulating chaperonin/ co-chaperonin interaction: humans versus *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2001 Feb 16;276(7):4981-4987.

Spackman MA, Munshi P, Dittrich B. Dipole moment enhancement in molecular crystals from X-ray diffraction data. *Chemphyschem*. 2007;8(14):2051-2063.
<http://www.bioparadigma.spb.ru/files/Spackman-2007-Dipole.Moment.Enhancement.pdf>

Tompa P, Csermely P. The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *FASEB J*. 2004 Aug;18(11):1169-1175.
<http://www.bioparadigma.spb.ru/files/Tompa-2004-The.role.of.structural.disorder.pdf>

Troshin AS. Problems of cell permeability. London, New York: Pergamon Press, 1966.

Uversky VN. Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci*. 2002;11(4):739-756.

Weikl T, Abelmann K, Buchner J. An unstructured C-terminal region of the Hsp90 co-chaperone p23 is important for its chaperone function. *J Mol Biol*. 1999;293(3):685-691.
<http://www.bioparadigma.spb.ru/files/Weikl-1999-An.Unstructured.C-Terminal.pdf>

Williams DH, O'Brien DP, Sandercock AM, Stephens E. Order changes within receptor systems upon ligand binding: receptor tightening/oligomerisation and the interpretation of binding parameters. *J Mol Biol*. 2004;340(2):373-383.

Wilson, E. B. *The Cell in Development and Heredity*. New York: Macmillan, 1928.

Wright PE, Dyson HJ. Linking folding and binding. *Curr Opin Struct Biol*. 2009;19(1):31-38.
<http://www.bioparadigma.spb.ru/files/Wright-2009-Linking.folding.and.binding.pdf>

Zheng JM and Pollack GH. Long-range forces extending from polymer-gel surfaces. *Phys Rev E* 2003;68:031408.
<http://www.bioparadigma.spb.ru/files/Zheng-2003-Long-range.forces.pdf>

Zheng JM, Chin WC, Khijniak E, Khijniak E Jr, Pollack GH. Surfaces and interfacial water: evidence that hydrophilic surfaces have long-range impact. Adv Colloid Interface Sci. 2006;127(1):19-27.

Линг Г. Физическая теория живой клетки. Незамеченная революция. Санкт-Петербург: Наука, 2008 г. 375 с. <http://www.bioparadigma.spb.ru/russianling/russianling.htm>

Насонов Д.Н. Местная реакции протоплазмы и распространяющееся возбуждение. Москва-Ленинград: Изд-во Академии наук СССР, 1962 г. 426 с.

Финкельштейн А.В. и Птицын О.Б. Физика белка. Москва: Книжный дом Университет, 2005 г. 456 с.

Интернет-ресурсы

Труды Линга, опубликованные в журнале «Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR»:

<http://www.physiologicalchemistryandphysics.com/>

<http://www.gilbertling.org/>

Pollack G.H. Water, Energy and Life (лекция):

<http://video.google.com/videoplay?docid=5647197665735558550>