

ФОЛДИНГ И СТАБИЛЬНОСТЬ БЕЛКА В ПРИСУТСТВИИ ОСМОЛИТОВ

© 2016 г. А.В. Фонин*, В.Н. Уверский* **, И.М. Кузнецова*, К.К. Туроверов* ***

*Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4

E-mail: alexfonin@incras.ru

**Отдел Молекулярной Медицины, Медицинский колледж Морзани, Университет Южной Флориды,
12901, Бульвар Брюса Доунса MDC07, Тампа, Флорида, США

***Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29

Поступила в редакцию 03.11.15 г.

Осмолиты – молекулы, одной из функций которых является выравнивание гидростатического давления между внутри- и внеклеточным пространством. Осмолиты накапливаются в клетке в ответ на стресс, вызванный изменением давления, температуры, рН, концентрации неорганических солей. Осмолиты могут предотвращать денатурацию нативных белков и способствовать фолдингу развернутых. Изучение влияния осмолитов на эти процессы имеет существенное значение для понимания механизмов фолдинга и функционирования белков *in vivo*. Действию осмолитов на белки посвящены десятки работ, не всегда согласующихся друг с другом. В настоящем обзоре предпринята попытка систематизировать имеющийся массив данных, посвященных этому вопросу, и рассмотреть проблему фолдинга и стабильности белков в растворах в присутствии осмолитов с единой точки зрения.

Ключевые слова: фолдинг, стабильность, осмолиты, белки, денатурация, осмотический стресс.

Поддержание постоянного объема клетки при изменении внутри- и внеклеточного осмотического давления необходимо для ее выживания. Изменение концентрации осмотически активных веществ во вне/внутриклеточной жидкости создает соответствующий осмотический градиент. Это приводит к набуханию или сжатию клетки вследствие проницаемости клеточной мембраны для воды. Выравнивание гидростатического давления между внутри- и внеклеточным пространством и, соответственно, стабильность клеточного объема достигаются путем транспорта ионов неорганических солей (Na^+ , K^+ , Cl^-) во вне/внутриклеточное пространство и транспорта/синтеза небольших органических веществ – осмолитов. Известно, что высокие концентрации солей токсичны для клетки, в то время как высокие концентрации большинства осмолитов (до нескольких сот миллимолей/литр) не оказывают негативного действия на клетку и ее компартменты [1,2]. Поэтому в ответ на осмотический стресс в клетках практически всех живых организмов происходит увеличение концентрации осмоли-

тов, несмотря на то, что осмолиты являются метаболитами и их накопление достаточно энергозатратно и происходит достаточно медленно [3]. Особенно высоки концентрации осмолитов в клетках организмов, вынужденных существовать в условиях постоянного давления и/или в среде с высоким содержанием солей. Например, концентрация одного из осмолитов – триметиламинооксида (ТМАО) – в клетках глубоководных рыб достигает 300 мМ и выше [4], а клетки печени австралийских пустынных мышей содержат до 5 М денатурирующего осмолита мочевины и 2,5 М нейтрализующих действие мочевины на белки осмолитов [5].

Оказалось, что ряд осмолитов оказывает стабилизирующее действие на белки, предотвращает их агрегацию и увеличивает функциональную активность белков [1,6–19]. Высокие концентрации осмолитов в цитоплазме наблюдаются не только при экстремальных значениях давления, но также рН, температуры среды, концентрации солей и денатурантов [20]. В связи с этим осмолиты часто называют «химическими шаперонами». Различным аспектам действия осмолитов на структуру и фолдинг белков посвящен этот обзор.

Сокращения: ТМАО – триметиламинооксид, DM-MBP – мутантная форма мальтозасвязывающего белка.

КЛАССИФИКАЦИЯ ОСМОЛИТОВ

Наиболее «естественная» классификация осмолитов – по химическому строению: аминокислоты и их производные, полиолы, аминоксиды [21]. Однако осмолиты одного химического «класса» могут оказывать различное действие на стабильность и функциональную активность белков, и наоборот, осмолиты из разных классов могут действовать на белки аналогичным образом. Поэтому осмолиты часто группируют по принципу их действия на белки. Существует несколько таких классификаций (таблица). Наиболее общая из них подразделяет осмолиты на денатурирующие (мочевина, аргинин, гистидин, лизин) и осмопротекторы (большинство других осмолитов). Необходимо отметить, что могут возникать условия, при которых денатурирующие осмолиты могут способствовать стабилизации белков, а осмопротекторы – вызывать их денатурацию [22]. По типу действия на структуру и функциональную активность белков осмопротекторы разделяют на совместимые осмолиты (полиолы, сахара и аминокислоты) и нейтрализующие (аминоксиды). Основная функция совместимых осмолитов состоит в противодействии осмотическому давлению, т.е. в поддержании клеточного объема. Поэтому осмолиты этого класса незначительно увеличивают стабильность белков и практически не оказывают действия на их функциональную активность. Нейтрализующие осмолиты выполняют в клетке принципиально другую функцию. Клетки ряда живых организмов содержат смесь денатурирующих и нейтрализующих осмолитов в различных соотношениях. Нейтрализующие осмолиты компенсируют дестабилизирующее действие денатурирующих осмолитов за счет значительного увеличения стабильности и функциональной активности белков. При этом некоторые осмолиты в определенных условиях ведут себя как совместимые, в других – как нейтрализующие.

В работе [23] авторы на основании анализа действия различных осмолитов на стабильность и функциональную активность РНКазы А выделяют три группы осмопротекторов: класс I (многоатомные спирты, аминокислоты и их производные), класс II (аминоксиды) и класс III (сахара). Осмолиты класса I не оказывают заметного влияния на величину изменения свободной энергии Гиббса перехода между нативным и развернутым состояниями РНКазы А (ΔG_D°), константу скорости (k_{cat}) и константу Михаэлиса (K_M) гидролиза цитидинмонофосфата. Осмолиты II класса увеличивают ΔG_D° и k_{cat} , уменьшая при этом K_M . В этой классифи-

кации осмолиты III класса способствуют увеличению ΔG_D° и уменьшению k_{cat} и K_M . Таким образом, осмолиты класса I можно отнести к совместимым, осмолиты II класса – к нейтрализующим, а осмолиты III класса к некоей промежуточной группе осмолитов.

В работе [24] предложена классификация осмолитов, основанная на их влиянии на путь сворачивания мутантной формы мальтозасвязывающего белка (DM-MBP). Авторы этой работы выделяют две группы осмолитов: осмолиты группы I (ГМАО и трегалоза) оказывает влияние на энтропийную составляющую свободноэнергетического барьера между нативным и развернутым состояниями DM-MBP. Осмолиты II группы (пролин и серин) воздействует преимущественно на энтальпийную составляющую свободноэнергетического барьера, соответственно.

СТАБИЛИЗАЦИЯ/ДЕСТАБИЛИЗАЦИЯ БЕЛКОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ОСМОЛИТОВ

В стрессовых условиях в клетке происходит значительное увеличение доли развернутых, частично-развернутых, неправильно свернутых и агрегированных форм белков [21]. Как уже упоминалось выше, увеличение концентрации осмопротекторов в клетке коррелирует с уменьшением содержания таких белковых форм. Это может быть следствием либо предотвращения осмолитами денатурации/агрегации нативных белков, либо рефолдинга развернутых белков. Как совместимые, так и нейтрализующие осмолиты способствуют предотвращению денатурации белков. Ренатурацию развернутых белков индуцируют преимущественно нейтрализующие осмопротекторы [20]. Предотвращение денатурации белков осмолитами более изучено, чем рефолдинг белков под действием осмолитов.

Как правило, стабилизация нативного состояния белка осмолитами объясняется либо преимущественной гидратацией белка вследствие уменьшения концентрации осмолитов в ближайшем окружении белковой поверхности, либо преимущественным связыванием осмолитов с белком [20]. К настоящему времени большинство исследователей склоняется к гипотезе, что основным механизмом, обеспечивающим стабилизацию белковой структуры осмопротекторами, является уменьшение концентрации осмолитов в ближайшем окружении белка [25–32]. Для теоретического описания этого эффекта наиболее часто используются модели предпочтительной гидратации белка (осмофобный эффект) и/или эффекта исключенного объема (так как исключенный объем молекул осмолитов

Классификация осмолитов

Название осмолита	Химическая структура	Классификация		
		По химическому строению	По действию на стабильность белков	По действию на фолдинг DM-MBP [24]
ТМАО		Метиламин	При нейтральных и щелочных рН является нейтрализующим осмопротектором, при кислых рН – денатурирующим осмолитом	Класс I
Бетаин		Метиламин	При нейтральных и щелочных рН является нейтрализующим осмопротектором, при кислых рН и высоких концентрациях становится денатурирующим осмолитом	Нет данных
Таурин		Производная аминокислоты	Совместимый осмопротектор	
Пролин		Аминокислота	Совместимый осмопротектор (может выступать в качестве денатурирующего осмолита для некоторых белков)	Класс II
Сорбитол		Многоатомный спирт	Совместимый осмопротектор (может выступать в качестве денатурирующего осмолита для некоторых белков)	Класс II
Трегалоза		Сахар	При кислых, нейтральных рН и низких концентрациях является совместимым осмолитом, при увеличении концентрации и щелочных рН становится денатурирующим осмолитом	Класс I
Мочевина		Амид	Денатурирующий осмолит (при низких концентрациях – осмопротектор)	Нет данных

больше исключенного объема молекул воды) [33]. Также выдвигалось предположение, что уменьшение концентрации осмолитов в ближайшем окружении белка является следствием увеличения поверхностного натяжения воды осмолитами, однако эта гипотеза распространения не получила [34,35]. Уменьшение concentra-

ции осмолитов в ближайшем окружении белка не может описываться только эффектом исключенного объема, так как в этом случае действие осмопротекторов на стабильность белка зависело бы исключительно от размера молекул осмолита [36]. Осмофобный характер взаимодействия некоторых осмолитов с рядом белков

был показан экспериментально [37,38]. Необходимо отметить, что введение осмолитов в раствор, при условии их исключения из ближайшего окружения белка, увеличивает химический потенциал системы, т.е. дестабилизирует ее [25–28]. Стабилизация белка в растворах в присутствии осмолитов объясняется тем, что концентрация молекул осмолитов в ближайшем окружении развернутого белка меньше, чем в окружении нативного белка [39,40]. Соответственно, разность химических потенциалов между нативным и денатурированным состояниями в растворах осмолитов больше, чем в буферных растворах, и переход белка из нативного в развернутое состояние в растворах осмопротекторов менее вероятен. При этом исключение молекул осмолита из границы раздела фаз поверхность белка/растворитель должно способствовать изменению структуры и, возможно, физико-химическим свойствам воды в ближайшем окружении белка [41,42]. Необходимо отметить, что стабилизация структуры белка в растворах осмолитов объясняется, в том числе, изменением сети внутримолекулярных водородных связей [43–46].

Тем не менее осмофобный эффект является не универсальным механизмом взаимодействия всех осмолитов с белками [22,47,48]. В работах [49,50] авторы, используя теорию Кирквуда–Баффа моделировали взаимодействие различных групп осмолитов с белками. Согласно этим работам, концентрация метиламинов, спиртов, аминокислот уменьшается в ближайшем окружении белка, причем в наибольшей степени уменьшается концентрация метиламинов – наиболее «сильных» осмопротекторов. Авторы предполагают, что наименее всего уменьшается концентрация сахаров в ближайшем окружении белка. При этом молекулы воды также накапливаются в ближайшем белковом окружении. Согласно данным этих работ, единственный осмолит, преимущественно связывающийся с белком и исключаяющий вследствие этого воду из ближайшего окружения белка, – осмолит, обладающий денатурирующим действием – мочевины.

При этом необходимо отметить, что стабилизация белковой структуры рядом осмолитов зависит от их концентрации и pH раствора [6,22,51,52]. Так, при $\text{pH} < 5$ осмопротектор ТМАО существенно дестабилизирует белки [52–54], стабилизация бетаином химерного белка GST-GFP существенно зависит от концентрации осмолита [6]. Отметим, что pK_a ТМАО равна 4,66, и при pH ниже этого значения большая часть молекул ТМАО имеет положительный заряд [55]. Соответственно, можно

предположить, что дестабилизация белков ТМАО при низких pH обусловлена преимущественным связыванием осмолита с поверхностью белка [54]. Существует ряд работ, авторы которых утверждают, что полярные группы осмопротекторов способны связываться с основной цепью белка, практически не взаимодействуя с гидрофобными участками и боковыми цепями белка [8,56–59]. Необходимо отметить, что, согласно работе [60], денатурирующий осмолит мочевины способна взаимодействовать с гидрофобными участками белковой цепи. На основании всего известного массива данных можно сделать общее заключение: стабильность белка в растворах осмолитов, вероятно, обусловлена балансом между преимущественной гидратацией белка вследствие уменьшения концентрации осмолитов в ближайшем окружении белка и преимущественным связыванием молекул осмолита с поверхностью белка [29,61].

ФОЛДИНГ БЕЛКОВ В РАСТВОРАХ ОСМОЛИТОВ

В течение последних десятилетий было убедительно показано, что осмопротекторы вызывают ренатурацию и подавляют агрегацию различных белков как *in vitro*, так и *in vivo* [1,9,20,21,62–77]. При этом необходимо отметить, что осмолиты могут концентрационно-зависимым способом регулировать активность молекулярных шаперонов GroEL, DnaK, ClpB [78–80].

Молекулярные механизмы процессов, способствующих фолдингу белка в растворах осмолитов, полностью не ясны [20,21]. Согласно работам Тимашева, осмолиты различным образом действуют на нативное и денатурированное состояние белка, дестабилизируя последнее [26,28,81]. По-видимому, осмолиты индуцируют рефолдинг и ингибируют агрегацию белков именно вследствие термодинамической невыгодности существования структуры белка в денатурированном или частично-денатурированном состоянии в растворах осмопротекторов. Необходимо отметить, что осмолиты не подвергают существенным изменениям структуру нативных белков [57,82,83]. Однако осмолиты способны влиять на структурную динамику нативных белков, уменьшая гетерогенность распределения конформеров белка в растворе [84–88]. Введение же осмолитов в раствор, содержащий денатурированные и частично денатурированные белки, вызывает компактизацию белковой структуры и уменьшение разнообразия ее конформаций [65,89–92]. Необходимо отметить, что компактизация развернутой струк-

туры белка может приводить к агрегации и неправильному сворачиванию белка, однако в растворах осмолитов этого не происходит [89]. Поэтому высказывается предположение, что осмолиты действуют преимущественно не на денатурированное, а на переходное или промежуточное состояние между нативным и развернутым белком [93]. Возникает вопрос: какова природа процессов, вызывающих рефолдинг белка в растворах осмолитов? Энтальпийная или энтальпийная?

Осмофобный характер взаимодействия большинства осмолитов с белками является сильным аргументом в пользу энтальпийной природы процессов, вызывающих ренатурацию белков в растворах осмолитов. При этом необходимо отметить, что из-за эффекта исключенного объема в растворах осмолитов число конформаций белковой цепи меньше, чем в буферных растворах, поэтому энтальпийный вклад в индуцирование ренатурации белков в растворах осмолитов может быть существенным. [94–97]. В работах [24,98] был исследован фолдинг медленно сворачивающегося мутанта мальтозасвязывающего белка *in vivo* и *in vitro*. Авторы этих статей показали, что различные осмолиты различным образом изменяют путь сворачивания этого белка. Так, ТМАО и трегалоза увеличивают свободноэнергетический барьер между развернутым состоянием белка и различными высокоэнергетическими промежуточными состояниями, возникающими при сворачивании белка, т.е. уменьшают энтропию системы и тем самым ускоряют фолдинг белка. Пролин и серин действуют на фолдинг ДМ-МВР другим образом: эти осмолиты уменьшают энтальпийную составляющую свободноэнергетического барьера между развернутым и нативным состояниями этого белка. Необходимо отметить, что отсутствие взаимодействия ТМАО с переходным состоянием, возникающим при разворачивании FYN-SH3-домена, было показано в работе [99].

Известно, что сворачивание одних и тех же белков в растворах одних и тех же осмолитов может протекать различным образом, если белки были различным образом денатурированы. Например, сворачивание ферроцитохрома *c* в растворах глицерола и сахаров, денатурированного под действием кислых рН, приводит к стабилизации промежуточного состояния типа расплавленной глобулы, в то время как сворачивание ферроцитохрома *c* в тех же условиях, но денатурированного под действием температуры, приводит к стабилизации нативного состояния этого белка [100]. РНКазы А, ренатурированная в растворах осмолитов из состоя-

ния, денатурированного под действием температуры и химических денатурантов, обладает различной каталитической активностью [10]. Таким образом, фолдинг белка в растворах осмолитов может быть обусловлен процессами как энтальпийной, так и энтальпийной природы и зависеть от химического строения осмолитов.

ОСМОЛИТЫ И НАТИВНЫЕ ВНУТРЕННЕ-НЕУПОРЯДОЧЕННЫЕ БЕЛКИ; ОСМОЛИТЫ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ КРАУДИНГ; СМЕСИ ОСМОЛИТОВ

Важную роль в понимании механизмов влияния осмолитов на белки *in vivo* и *in vitro* играет изучение действия осмолитов на структуру и фолдинг нативных неупорядоченных белков. Нативные неупорядоченные белки играют исключительно важную роль во всех биологических процессах [101]. Такие белки способны формировать компактную упорядоченную структуру только при взаимодействии со своими партнерами [102]. Существует ряд работ, посвященных возможности нативных неупорядоченных белков принимать компактную упорядоченную структуру в растворах осмолитов, не взаимодействуя при этом со своими партнерами [66,103–106]. Например, для РНКазы Р в работе [66] показано, что нативная структура белка в комплексе с РНК и структура, возникающая при ренатурации этого белка в растворе ТМАО, аналогичны, но не идентичны, и пути сворачивания этого белка в присутствии РНК и в ее отсутствие, но в присутствии ТМАО, существенно отличаются. Как правило, структура нативных частично или полностью неупорядоченных белков, возникающая в растворах осмолитов, подобна структуре комплексов этих белков с их лигандами, но не идентична ей.

Белки существуют и функционируют в клетке в условиях молекулярного краудинга, т.е. в условиях, когда свободный объем, незанятый другими молекулами, существенно ограничен [2]. Для моделирования условий краудинга *in vitro* используются высококонцентрированные растворы инертных полимеров (краудинг-агентов) [107]. Показано, что осмолиты в условиях молекулярного краудинга, как правило, способствуют компактизации белковой структуры, увеличивают стабильность белков и предотвращают их агрегацию, т.е. в целом осмолиты действуют на белки в условиях молекулярного краудинга почти так же, как в разбавленных слабосолевых буферных растворах [63,108–114]. При этом необходимо отметить, что в условиях молекулярного краудинга

структура внутренне неупорядоченных белков не претерпевает существенных изменений [115,116], что свидетельствует о том, что эффект исключенного объема не играет решающей роли при взаимодействии осмолитов с белками.

В клетках, как правило, присутствует не один, а несколько типов осмолитов, часто выполняющих различные функции и даже противоположным образом влияющие на стабильность и функциональную активность белков. Так, клетки акул содержат мочевины и ТМАО в «классическом» соотношении 2:1, в клетках печени млекопитающих помимо мочевины содержатся мио-инозитол, сорбитол, бетаин, таурин, глицерофосфорилхолин, ряд полиолов и метиламинов [4,117–119]. Функция нейтрализующих осмолитов в клетках, содержащих смесь мочевины и осмопротекторов, состоит в противодействии денатурирующему действию мочевины и восстановлении структуры и функциональной активности белка и в общем достаточно ясна [20,120,121]. При этом возникает вопрос: насколько независимо осмолиты действуют на белки? Синэргично ли действие одноклассных осмолитов? Ряд работ посвящен этому вопросу [122–126]. Некоторые авторы утверждают, что действие осмолитов на белки не зависит от присутствия в растворе других осмолитов [122,127], другие, что осмолиты действуют на белки синэргично [124,125,128]. Росген, основываясь на уравнении, связывающем стабильность и сольватируемость белка, предполагает [124], что синэргичное действие осмолитов на белки является нормой и незначительное число работ, подтверждающих это предположение, обусловлено экспериментальными трудностями при определении синэргичности действия осмолитов на белки. Причинами, вызывающими синэргичность действия осмолитов на молекулярном уровне, считаются взаимозависимое изменение сольватируемости белка осмолитами и изменение химической активности отдельных осмолитов в их смеси [123,124].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Понимание механизмов действия осмолитов на белки не только критически важно для изучения функциональной активности и фолдинга белков в клетке, но и имеет существенное практическое значение. На сегодняшний день известно несколько десятков тяжелых заболеваний, связанных с неправильным сворачиванием или агрегацией белков. Использование осмолитов (и их смесей) как потенциальных нетоксичных терапевтических агентов, подавляющих агрегацию и неправильное сворачивание бел-

ков, вызывающих «конформационные» болезни, может быть перспективно. Необходимо отметить, что, например, трегалоза предотвращает фибриллизацию Аβ-пептида, что может быть использовано при терапии болезни Альцгеймера [129]. Защитные свойства осмолитов можно также использовать при хранении и транспортировке различных белков, в частности антител на различные антигены.

Кроме изучения фолдинга, функциональной активности и стабильности белков в присутствии осмолитов, огромный интерес представляет исследование регуляторной роли осмолитов в клетке. Эта тема еще практически не изучена.

Данная статья подготовлена по материалам V Съезда биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-24-00131). Работа А.В. Фокина поддержана Советом по грантам при Президенте РФ (Стипендия СП-1725.2015.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Z. Ignatova and L. M. Gierasch, *Methods Enzymol* **428** (2007).
2. N. A. Chebotareva, *Biochemistry (Mosc)* **72** (13), (2007).
3. P. H. Yancey, M. E. Clark, S. C. Hand, et al., *Science* **217** (4566), (1982).
4. P. H. Yancey, *J. Exp. Biol.* **208** (Pt 15), (2005).
5. R. E. MacMillen and A. K. Lee, *Science* **158** (3799), (1967).
6. A. Natalello, J. Liu, D. Ami, et al., *Proteins* **75** (2), (2009).
7. N.-Y. Fang, J. Lee, S.-J. Yin, et al., *Process Biochem.* **49** (6), (2014).
8. T. O. Street, D. W. Bolen, and G. D. Rose, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** (38), (2006).
9. Z. Ignatova and L. M. Gierasch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** (36), (2006).
10. M. Warepam, G. S. Sharma, T. A. Dar, et al., *PLoS One* **9** (10), (2014).
11. P. Attri, P. Venkatesu, and M. J. Lee, *J. Phys. Chem. B* **114** (3), (2010).
12. J. E. Nuss, L. M. Wanner, L. E. Tressler, and S. Bavari, *J. Biomol. Screen* **15** (8), (2010).
13. N. A. Chebotareva, B. I. Kurganov, S. E. Harding, and D. J. Winzor, *Biophys. Chem.* **113** (1), (2005).
14. M. Gulotta, L. Qiu, R. Desamero, et al., *Biochemistry* **46** (35), (2007).
15. T. Schultz, J. Liu, P. Capasso, and A. de Marco, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355** (1), (2007).
16. K. Hatori, T. Iwasaki, and R. Wada, *Biophys. Chem.* **193-194** (2014).
17. E. P. O'Brien, G. Ziv, G. Haran, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** (36), (2008).

18. J. K. Kaushik and R. Bhat, *J. Biol. Chem.* **278** (29), (2003).
19. T. R. Silvers and J. K. Myers, *Biochemistry* **52** (51), (2013).
20. L. R. Singh, N. K. Poddar, T. A. Dar, et al., *J. Iran. Chem. Soc.* **8** (1), (2011).
21. R. Kumar, *Arch. Biochem. Biophys.* **491** (1-2), (2009).
22. L. R. Singh, N. K. Poddar, T. A. Dar, et al., *Life Sci.* **88** (3-4), (2011).
23. S. Jamal, N. K. Poddar, L. R. Singh, et al., *FEBS J.* **276** (20), (2009).
24. R. Dandage, A. Bandyopadhyay, G. G. Jayaraj, et al., *ACS Chem. Biol.* **10** (3), (2015).
25. S. N. Timasheff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (13), (1998).
26. S. N. Timasheff, *Biochemistry* **41** (46), (2002).
27. S. N. Timasheff, *Biophys. Chem.* **101-102** (2002).
28. S. N. Timasheff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** (15), (2002).
29. S. N. Timasheff, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22** (1993).
30. T. Arakawa and S. N. Timasheff, *Biophys. J.* **47** (3), (1985).
31. Y. L. Shek and T. V. Chalikian, *Biochemistry* **52** (4), (2013).
32. A. Mukaiyama, Y. Koga, K. Takano, and S. Kanaya, *Proteins* **71** (1), (2008).
33. D. W. Bolen, *Methods* **34** (3), (2004).
34. M. Auton, A. C. Ferreón, and D. W. Bolen, *J. Mol. Biol.* **361** (5), (2006).
35. T. Y. Lin and S. N. Timasheff, *Protein Sci.* **5** (2), (1996).
36. G. T. Weatherly and G. J. Pielak, *Protein Sci.* **10** (1), (2001).
37. D. Aioanei, S. Ly, I. Tessari, et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **50** (19), (2011).
38. D. Aioanei, I. Tessari, L. Bubacco, et al., *Proteins* **79** (7), (2011).
39. D. W. Bolen and I. V. Baskakov, *J. Mol. Biol.* **310** (5), (2001).
40. T. Q. Faria, J. C. Lima, M. Bastos, et al., *J. Biol. Chem.* **279** (47), (2004).
41. G. Saladino, M. Marenchino, S. Pieraccini, et al., *J. Chem. Theory. Comput.* **7** (11), (2011).
42. F. Despa, D. P. Orgill, and R. C. Lee, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1066** (2005).
43. D. W. Bolen and G. D. Rose, *Annu. Rev. Biochem.* **77** (2008).
44. F. Guo and J. M. Friedman, *J. Phys. Chem. B* **113** (52), (2009).
45. L. M. Holthausen, J. Rosgen, and D. W. Bolen, *Biochemistry* **49** (6), (2010).
46. C. J. Roche, F. Guo, and J. M. Friedman, *J. Biol. Chem.* **281** (50), (2006).
47. R. D. Macdonald and M. Khajepour, *Biophys. Chem.* **184** (2013).
48. B. Zelent, C. Buettger, J. Grimsby, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1824** (5), (2012).
49. M. Auton, D. W. Bolen, and J. Rosgen, *Proteins* **73** (4), (2008).
50. M. Auton, J. Rosgen, M. Sinev, et al., *Biophys. Chem.* **159** (1), (2011).
51. S. Habib, M. A. Khan, and H. Younus, *Protein J.* **26** (2), (2007).
52. V. Granata, P. Palladino, B. Tizzano, et al., *Biopolymers* **82** (3), (2006).
53. O. P. Chilson and A. E. Chilson, *Eur. J. Biochem.* **270** (24), (2003).
54. R. Singh, I. Haque, and F. Ahmad, *J. Biol. Chem.* **280** (12), (2005).
55. T. Y. Lin and S. N. Timasheff, *Biochemistry* **33** (42), (1994).
56. L. B. Sagle, K. Cimatú, V. A. Litosh, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **133** (46), (2011).
57. M. V. Athawale, J. S. Dordick, and S. Garde, *Biophys. J.* **89** (2), (2005).
58. S. S. Cho, G. Reddy, J. E. Straub, and D. Thirumalai, *J. Phys. Chem. B* **115** (45), (2011).
59. J. Hong, L. M. Gierasch, and Z. Liu, *Biophys. J.* **109** (1), (2015).
60. S. Shimizu, *Chem. Phys. Lett.* **517** (1-3), (2011).
61. O. Miyawaki, M. Dozen, and K. Nomura, *Biophys. Chem.* **185** (2014).
62. P. Zancan and M. Sola-Penna, *Arch. Biochem. Biophys.* **444** (1), (2005).
63. C. Ercole, J. P. Lopez-Alonso, J. Font, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **506** (2), (2011).
64. S. H. Kim, Y. B. Yan, and H. M. Zhou, *Biochem. Cell Biol.* **84** (1), (2006).
65. L. Chen, J. A. Ferreira, S. M. Costa, et al., *Biochemistry* **45** (7), (2006).
66. Y. C. Chang and T. G. Oas, *Biochemistry* **49** (25), (2010).
67. R. D. Bhavsar, S. Prasad, and I. Roy, *Biochimie* **95** (11), (2013).
68. Y. Xia, Y. D. Park, H. Mu, et al., *Int. J. Biol. Macromol.* **40** (5), (2007).
69. B. I. Kurganov, *Biochemistry (Mosc)* **78** (13), (2013).
70. B. Murray, J. Rosenthal, Z. Zheng, et al., *Langmuir* **31** (14), (2015).
71. N. A. Chebotareva, T. B. Eronina, S. G. Roman, et al., *Int. J. Biol. Macromol.* **60** (2013).
72. T. B. Eronina, N. A. Chebotareva, and B. I. Kurganov, *Biochemistry (Mosc)* **70** (9), (2005).
73. Z. Ignatova, B. Krishnan, J. P. Bombardier, et al., *Biopolymers* **88** (2), (2007).
74. P. J. Bujalowski and A. F. Oberhauser, *Methods* **60** (2), (2013).
75. A. M. Thangakani, S. Kumar, D. Velmurugan, and M. S. Gromiha, *Proteins* **80** (4), (2012).
76. M. Jacob, T. Schindler, J. Balbach, and F. X. Schmid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (11), (1997).

77. K. W. Plaxco and D. Baker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (23), (1998).
78. H. Katayama, M. McGill, A. Kearns, et al., *J. Struct. Funct. Genomics* **10** (1), (2009).
79. S. Naik, I. Haque, N. Degner, et al., *Biopolymers* **93** (3), (2010).
80. S. Diamant, N. Eliahu, D. Rosenthal, and P. Goluboinoff, *J. Biol. Chem.* **276** (43), (2001).
81. J. C. Lee and S. N. Timasheff, *J. Biol. Chem.* **256** (14), (1981).
82. I. Baskakov and D. W. Bolen, *J. Biol. Chem.* **273** (9), (1998).
83. G. S. Ratnaparkhi and R. Varadarajan, *J. Biol. Chem.* **276** (31), (2001).
84. R. H. Flores Jimenez, M. A. Do Cao, M. Kim, and D. S. Cafiso, *Protein Sci.* **19** (2), (2010).
85. T. O. Street, K. A. Krukenberg, J. Rosgen, et al., *Protein Sci.* **19** (1), (2010).
86. B. S. Kendrick, B. S. Chang, T. Arakawa, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (22), (1997).
87. P. Cioni, E. Bramanti, and G. B. Strambini, *Biophys. J.* **88** (6), (2005).
88. R. Jain, D. Sharma, S. Kumar, and R. Kumar, *Biochemistry* **53** (32), (2014).
89. E. P. Melo, N. Estrela, C. Lopes, et al., *Curr. Protein Pept. Sci.* **11** (8), (2010).
90. L. Pradeep and J. B. Udgaonkar, *J. Biol. Chem.* **279** (39), (2004).
91. C. C. Mello and D. Barrick, *Protein Sci.* **12** (7), (2003).
92. P. K. Devaraneni, N. Mishra, and R. Bhat, *Biochimie* **94** (4), (2012).
93. L. Dougan, G. Z. Genchev, H. Lu, and J. M. Fernandez, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108** (24), (2011).
94. J. Mondal, D. Halverson, I. T. Li, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112** (30), (2015).
95. L. Sapir and D. Harries, *J. Phys. Chem. Lett.* **5** (7), (2014).
96. R. Politi and D. Harries, *Chem. Commun. (Camb)* **46** (35), (2010).
97. F. Rodriguez-Ropero and N. F. van der Vegt, *J. Phys. Chem. B* **118** (26), (2014).
98. A. Bandyopadhyay, K. Saxena, N. Kasturia, et al., *Nat. Chem. Biol.* **8** (3), (2012).
99. S. L. Lin, A. Zarrine-Afsar, and A. R. Davidson, *Protein Sci.* **18** (3), (2009).
100. A. J. Saunders, P. R. Davis-Searles, D. L. Allen, et al., *Biopolymers* **53** (4), (2000).
101. V. N. Uversky, *Protein J.* **28** (7-8), (2009).
102. K. K. Turoverov, I. M. Kuznetsova, and V. N. Uversky, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **102** (2-3), (2010).
103. I. V. Baskakov, R. Kumar, G. Srinivasan, et al., *J. Biol. Chem.* **274** (16), (1999).
104. P. Wu and D. W. Bolen, *Proteins* **63** (2), (2006).
105. K. Yegambaram, E. M. Bulloch, and R. L. Kingston, *Protein Sci.* **22** (11), (2013).
106. Z. A. Levine, L. Larini, N. E. LaPointe, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112** (9), (2015).
107. I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov, and V. N. Uversky, *Int. J. Mol. Sci.* **15** (12), (2014).
108. M. Sarkar and G. J. Pielak, *Protein Sci.* **23** (9), (2014).
109. L. Breydo, A. E. Sales, L. Ferreira, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **570** (2015).
110. Y. Q. Fan, J. Lee, S. Oh, et al., *Int. J. Biol. Macromol.* **51** (5), (2012).
111. N. A. Chebotareva, I. E. Andreeva, V. F. Makeeva, et al., *J. Mol. Recognit.* **17** (5), (2004).
112. N. N. Sluchanko, N. A. Chebotareva, N. B. Gusev, *Biochimie* **108** (2015).
113. N. A. Chebotareva, A. V. Meremyanin, V. F. Makeeva, and B. I. Kurganov, in: *Prog. Colloid Polym. Sci.*, Ed by Wandrey C., Culfen H. (2006), pp. 83-92.
114. Y. Abe, T. Ohkuri, S. Yoshitomi, et al., *Amino Acids* **47** (5), (2015).
115. C. S. Szasz, A. Alexa, K. Toth, et al., *Biochemistry* **50** (26), (2011).
116. J. M. Mouillon, S. K. Eriksson, and P. Harryson, *Plant. Physiol.* **148** (4), (2008).
117. S. Bagnasco, R. Balaban, H. M. Fales, et al., *J. Biol. Chem.* **261** (13), (1986).
118. M. B. Burg, *Am. J. Physiol.* **268** (6 Pt 2), (1995).
119. L. R. Singh, T. A. Dar, and F. Ahmad, *J. Biosci.* **34** (2), (2009).
120. N. Kumar and N. Kishore, *Biophys. Chem.* **189** (2014).
121. L. Ma, M. Xu, and A. F. Oberhauser, *J. Biol. Chem.* **285** (49), (2010).
122. L. M. Holthausen and D. W. Bolen, *Protein Sci.* **16** (2), (2007).
123. J. A. Schellman, *Biophys. J.* **85** (1), (2003).
124. J. Rosgen, *J. Phys. Chem. B* **119** (1), (2015).
125. M. Warepam and L. R. Singh, *Arch. Biochem. Biophys.* **573** (2015).
126. A. Mukherjee, M. K. Santra, T. K. Beuria, and D. Panda, *FEBS J.* **272** (11), (2005).
127. N. K. Poddar, Z. A. Ansari, R. K. Singh, et al., *Biophys. Chem.* **138** (3), (2008).
128. G. Bomhoff, K. Sloan, C. McLain, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **453** (1), (2006).
129. R. Liu, H. Barkhordarian, S. Emadi, et al., *Neurobiol. Dis.* **20** (1), (2005).

Protein Folding and Stability in the Presence of Osmolytes

A.V. Fonin*, **V.N. Uversky* ****, **I.M. Kuznetsova***, and **K.K. Turoverov* *****

**Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretsky prosp. 4, St. Petersburg, 194064 Russia*

***Department of Molecular Medicine, College of Medicine, University of South Florida,
12901 Bruce B. Downs Blvd. MDC07, Tampa, Florida, USA*

****St. Petersburg State Polytechnical University, ul. Polytechnicheskaya 29, St. Petersburg, 195251 Russia*

Osmolytes are molecules with the function among others to align hydrostatic pressure between intracellular and extracellular spaces. Accumulation of osmolytes occurs in the cell in response to stress caused by pressure change, change in temperature, pH, and concentration of inorganic salts. Osmolytes can prevent native proteins denaturation and promote folding of unfolding proteins. Investigation of the osmolytes effect on these processes is essential for understanding the mechanisms of folding and functioning of proteins *in vivo*. A score of works, devoted to the effect of osmolytes on proteins, are not always consistent with each other. In this review an attempt was made to systemize available array of data on the subject and consider the problem of folding and stability of proteins in solutions in the presence of osmolytes from the single viewpoint.

Key words: folding, stability, osmolytes, proteins, denaturation, osmotic stress