

На правах рукописи

ПОВАРОВА
Ольга Игоревна

КИНЕТИКА ОБРАЗОВАНИЯ И СВОЙСТВА ПРОМЕЖУТОЧНЫХ И
НЕПРАВИЛЬНО СВЕРНУТЫХ МОНОМЕРНЫХ И
АГРЕГИРОВАННЫХ ФОРМ АКТИНА

03.00.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2005

Работа выполнена в Институте цитологии РАН, Санкт-Петербург

Научные руководители: доктор физико-математических наук
Константин Константинович ТУРОВЕРОВ,
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
кандидат биологических наук
Ирина Михайловна КУЗНЕЦОВА,
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Владимир Иосифович ВОРОБЬЕВ,
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
доктор биологических наук,
Надежда Владимировна КУЛЕВА
*Биолого-почвенный факультет, СПбГУ,
Санкт-Петербург*

Ведущая организация: Биологический факультет Московского
Государственного Университета
имени М.В. Ломоносова

Защита состоится "9" декабря 2005 года в 13 ч. на заседании Диссертационного совета Д.002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН.
Автореферат разослан "8" ноября 2005 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Е. В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Вопрос о том, как белки сворачиваются в уникальное компактное высокоорганизованное функционально-активное состояние, является одним из центральных вопросов физико-химической и клеточной биологии. Основным подходом к решению проблемы фолдинга белков является изучение процессов их сворачивания–разворачивания и характеристика возникающих при этом промежуточных частично-свернутых и неправильно свернутых состояний.

Стабилизация структуры неправильно свернутых состояний, возникающих в процессе сворачивания–разворачивания белков, часто осуществляется за счет их ассоциации и агрегации. При этом могут возникать как неупорядоченные аморфные агрегаты, так и упорядоченные структуры – амилоидные фибриллы (Kelly, 2000; Fink, 1998). Возникновение неправильно свернутых аморфных агрегированных форм рекомбинантных белков и их аккумуляция в телах включения (Frankel et al., 1990; Wetzel, 1992; Speed et al., 1996) является существенной проблемой биотехнологии. Фибриллогенез является причиной возникновения ряда тяжелых заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, прионные болезни и т.д., которые иногда называют конформационными болезнями (Carrell and Gooptu, 1998; Kelly, 1997; Harper and Lansbury 1997; Koo et al., 1999; Hashimoto and Masliah, 1999; Fink, 1998). Таким образом, изучение структуры и путей образования денатурированных частично-свернутых агрегированных (ассоциированных) форм белков важно не только для решения фундаментальной проблемы фолдинга белка, но имеет также большое практическое значение.

Большинство исследований по изучению фолдинга белков выполнено на небольших однодоменных белках, для которых процесс разворачивания является обратимым. Актуальным является изучение путей сворачивания более сложных мультидоменных белков, а также изучение возникающих при этом промежуточных и неправильно свернутых агрегированных форм белков. Актин, один из основных белков системы мышечного сокращения и цитоскелета эукариотических клеток, – чрезвычайно интересная модель для такого рода исследований.

Цель и задачи исследования. Цель работы состояла в изучении процессов сворачивания–разворачивания глобулярного актина. В задачи исследования входило:

1. Изучение кинетики разворачивания актина и образования инактивированного актина под действием гуанидингидрохлорида (GdnHCl) различной концентрации, поиск возможных кинетических интермедиатов, возникающих при реализации этих процессов.

2. Выяснение места инактивированного актина в процессах сворачивания–разворачивания белка.

3. Изучение влияния GdnHCl на свойства инактивированного актина.

4. Выяснение причин необратимости процесса разворачивания актина *in vitro*.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разворачивание актина проходит через образование двух, до этого неизвестных, кинетических интермедиатов N* и U*, возникающих на ранних стадиях денатурации актина.

2. В состоянии U* макромолекула актина существенно развернута, однако ее свойства отличаются от свойств полностью развернутого актина.

3. Инактивированный актин, долгое время считавшийся промежуточным состоянием на пути разворачивания–сворачивания белка, является моодисперсным ассоциатом лишь в водных растворах. В присутствии GdnHCl происходит агрегация ассоциатов, обусловленная изменением поверхностного заряда инактивированного актина.

Научная новизна. Показано существование двух ранее неизвестных кинетических интермедиатов, возникающих на ранних стадиях денатурации актина (N* и U*). Охарактеризован существенно развернутый интермедиат U* и, в частности, показано, что свойства этого интермедиата отличаются от свойств полностью развернутого актина. Предложена новая схема процессов сворачивания–разворачивания актина, согласно которой обнаруженные кинетические интермедиаты являются промежуточными состояниями на пути разворачивания актина, в то время как инактивированный актин является ассоциатом частично-свернутых денатурированных макромолекул белка.

Показано, что инактивированный актин является моодисперсным ассоциатом лишь в водном растворе. В присутствии GdnHCl происходит агрегация ассоциатов. Размеры агрегатов инактивированного актина зависят от концентрации денатуранта. Эффект объяснен изменением поверхностного заряда инактивированного актина при его взаимодействии с ионами GuH^+ .

Теоретическое и практическое значение. Новые представления о процессах сворачивания–разворачивания актина, полученные в настоящей работе, существенны для понимания процессов фолдинга этого белка. Обнаружение и характеристика ранее неизвестных интермедиатов, а также выяснение роли инактивированного актина в процессе сворачивания–разворачивания, может явиться основой для проведения дальнейших исследований, направленных на поиск путей ренатурации полностью развернутого актина *in vitro*. Результаты работы используются при проведении лекционно-практических занятий для студентов 4 курса Кафедры биофизики СПбГПУ.

Существенной методической разработкой является использование параметрического метода представления экспериментальных данных по денатурации белков (Бурштейн, 1976) для анализа результатов кинетических экспериментов. Этот подход, позволивший охарактеризовать свойства вновь обнаруженного кинетического интермедиата актина U^* , не только широко используется в нашей лаборатории, но и другими исследователями (см. например, Altschuler et al., 2005).

Апробация работы. Основные положения работы были представлены на Международном симпозиуме “Biological motility: new trends of research” (Пушино, 2001, 2004), на III Съезде биохимического общества (Санкт-Петербург, 2002), на 8-й Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых (Пушино, 2004), на III Съезде биофизиков России (Воронеж, 2004).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ.

Финансовая поддержка работы. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП "Материаловедение и диагностика в передовых технологиях" при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 00-04-49224, 02-04-06995_мас, 02-04-81013_Бел, 04-04-49622), Программы МКБ РАН, и INTAS (грант 01-2347).

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из Введения, трех Глав, Выводов и Списка публикаций. В первой главе дан обзор литературы, посвященной проблеме фолдинга белков и структуре актина. Во второй главе приводится описание использованных в работе материалов и методов исследования. И, наконец, в третьей главе изложены результаты и их обсуждение. Диссертация изложена на 115 страницах, содержит 6 таблиц и 34 рисунка. Библиография включает 129 наименований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. В работе использовались препараты G-актина, выделенные из скелетных мышц кролика с использованием стандартной методики (Pardee and Spudich, 1982). Контроль за нативностью препаратов актина осуществляли путем регистрации параметра A , характеризующего положение спектра флуоресценции (см. ниже). Использовали препараты актина, для которых величина A была не менее 2.53, что соответствует содержанию инактивированного актина не более 4 % (Turoverov et al., 1976). Актин в буфере G (0.2 mM АТФ, 0.1 mM CaCl₂, 1 mM NaN₃, 0.5 mM DTT, 5 mM трис-HCl, pH 8.2) хранили на льду и использовали в течение недели, ежедневно контролируя нативность препарата. Инактивированный актин получали из G-актина путем его инкубирования при температуре 70 °С в течение 30 мин. Концентрацию актина в растворе определяли путем регистрации оптической плотности с помощью спектрофотометра фирмы Hitachi (Япония) с использованием известных данных о коэффициенте молярной экстинкции актина $E_{280} = 1.09 \text{ (мг/мл)}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (Rees and Young, 1967). В большинстве экспериментов концентрация растворов актина составляла от 0.1 до 0.44 мг/мл.

В работе использованы 1,8-анилино-нафталин сульфонат (АНС) и NaN₃ (Serva, США); формамид и DTT (Wako, Япония); АТФ, трис, CaCl₂, гуанидингидрохлорид (GdnHCl) и мочевины (Sigma, США) без дополнительной очистки.

Методы. Флуоресцентные измерения были выполнены с использованием спектрофлуориметрической установки со стационарным возбуждением (Туроверов и др., 1998). Спектрофлуориметр оборудован термостатом, поддерживающим постоянную температуру в кювете и в специальной камере, где образцы выдерживали перед измерениями.

Флуоресценцию возбуждали на длинноволновом краю спектра поглощения белка, т.е. в условиях, когда флуоресценция обусловлена исключительно триптофановыми остатками. Положение и форму спектра флуоресценции характеризовали величиной параметра $A = (I_{320} / I_{365})_{297}$, где I_{320} и I_{365} – интенсивности флуоресценции, зарегистрированные при длинах волн 320 и 365 нм, соответственно; длина волны возбуждающего света 297 нм (Туроверов и др., 1998). Значение величины параметра A и спектры флуоресценции были исправлены на спектральную чувствительность установки. Интенсивность флуоресценции гидрофобного зонда АНС регистрировали при $\lambda_{возб} = 365$ нм и $\lambda_{рег} = 480$ нм.

Все кинетические эксперименты были выполнены в микрокуветах 101.016-QS 5×5 мм (Helma, Германия). При проведении кинетических экспериментов перевод белка в растворы с различной концентрацией GdnHCl выполнялся путем ручного смешивания раствора белка (50 мкл) с буфером, содержащим соответствующую концентрацию GdnHCl (350 мкл). В экспериментах по ренатурации необходимую концентрацию GdnHCl получали разведением растворов актина в 4 М GdnHCl G-буфером. Измерение быстрой кинетики выполняли с помощью аппаратуры стоп-флоу MOS 450 фирмы Bio-Logic в лаборатории д-ра Форже (CEA, Гренобль). Конечная концентрация GdnHCl в растворах контролировалась по показателю преломления с использованием рефрактометра ИРФ-454Б (ЛОМО, Россия).

Для построения кинетических кривых анизотропии флуоресценции использовали временные зависимости вертикальной (I_V^V) и горизонтальной (I_H^V) составляющей интенсивности флуоресценции, на основании которых определяли анизотропию:

$$r = (I_V^V - GI_H^V) / (I_V^V + 2GI_H^V)$$

где G – коэффициент, характеризующий различие чувствительности установки к вертикально и горизонтально поляризованному свету ($G = I_V^H / I_H^H$). Кинетические кривые параметра A построены на основании измерения временных зависимостей интенсивностей флуоресценции, зарегистрированных при длинах волн 320 и 365 нм.

Для анализа зарегистрированных кинетических зависимостей интенсивности флуоресценции был использован метод “фазовых диаграмм” (Бурштейн, 1976), основанный на построении параметрических зависимостей двух независимых экстенсивных характеристик, в качестве которых были использованы интенсивности флуоресценции, измеренные при длинах волн 320 и 365 нм. Параметром выступало время, прошедшее после добавления к нативному актину растворов GdnHCl различной концентрации.

Регистрация спектров КД дальней УФ-области была выполнена с использованием дихрографа Mark V (Jobin-Yvon, США). Длина оптического пути используемых кювет 0.1 см. При построении КД спектра белка учитывался спектр КД растворителя.

Кинетику затухания фосфоресценции при комнатной температуре (ФКТ) регистрировали с помощью автоматизированного высокочувствительного устройства с

монохроматорами в каналах возбуждения и регистрации (Институт фотобиологии НАН, Минск). Возбуждение флуоресценции проводили при $\lambda = 297$ нм, регистрацию кинетики затухания флуоресценции при $\lambda = 445$ нм. ФКТ актина измеряли в кварцевой кювете с длиной оптического пути, равной 2 мм. Кислород из растворов белка удаляли с помощью сульфита натрия. Время инкубации с сульфитом натрия составляло 7 мин.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

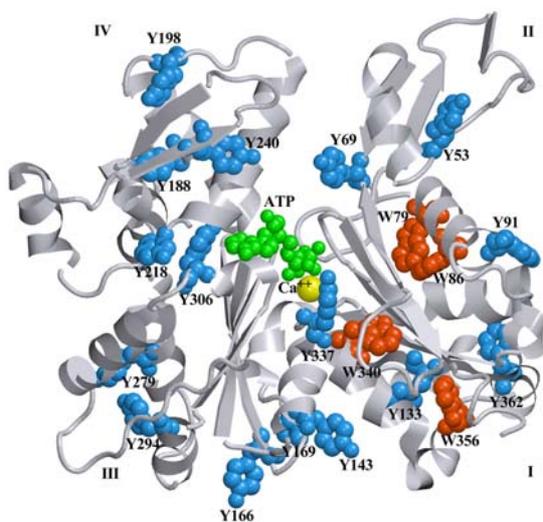


Рис. 1. Пространственная структура молекулы актина.

Актин, один из основных белков системы мышечного сокращения, является глобулярным двухдоменным белком. При низкой ионной силе актин является мономером (G-актин), в присутствии нейтральных солей он полимеризуется с образованием двухнитевой спирали (F-актин). F-актин является основным компонентом тонких филаментов мышечной ткани. В состав макромолекулы входит одна молекула АТФ и прочно связанный двухвалентный катион Ca^{2+} (Kabsch et al., 1990, рис. 1).

До недавнего времени считалось, что процесс сворачивания–разворачивания актина проходит через стадию образования промежуточного состояния, получившего название инактивированного актина (Lewis et al., 1963; Lehrer and Kerwar, 1972; Bertazzon et al., 1990; Turoverov et al., 1999; Schuler et al., 2000). Было показано, что денатурированное состояние, в котором актин не способен к полимеризации (инактивированный актин) возникает при отщеплении катиона кальция, в результате тепловой денатурации, под воздействием умеренных концентраций мочевины или GdnHCl, путем диализа из растворов 8 М мочевины или 6 М GdnHCl и даже спонтанно при длительном хранении препаратов (Kuznetsova et al., 1999a).

Характер равновесных (а точнее квазиравновесных) зависимостей ряда флуоресцентных характеристик актина от концентрации гуанидингидрохлорида (GdnHCl), казалось бы однозначно свидетельствует о существовании двух последовательных конформационных переходов и о существовании области концентраций GdnHCl, в которой актин находится преимущественно в инактивированном состоя-

нии (рис. 2). На основании подобного рода данных во всех без исключения работах, ботах, посвященных денатурации актина, считалось, что инактивированный актин (I) является промежуточным состоянием между нативным (N) и полностью развернутым (U) состоянием белка



В эту схему, однако, совершенно не укладываются данные о том, что инактивированный актин является термодинамически стабильным монодисперсным ассоциатом, состоящим из 15 мономерных единиц, (Kuznetsova et al., 1999b). В связи с этим в настоящей работе было предпринято более тщательное, с привлечением новых методических подходов, исследование равновесных (квазиравновесных) денатурационных зависимостей, а также кинетики разворачивания актина и образования инактивированного актина.

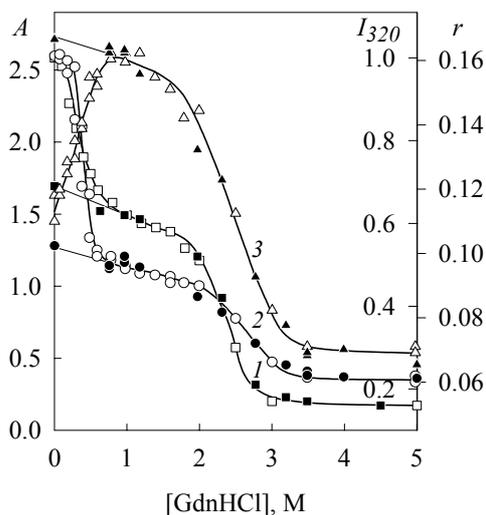


Рис. 2. Изменение параметров собственной флуоресценции актина под действием GdnHCl (Kuznetsova et al., 1999a). 1 – интенсивность флуоресценции, зарегистрированная при длине волны 320 нм (I_{320}); 2 – параметр $A = (I_{320}/I_{365})_{297}$; 3 – анизотропия флуоресценции, r ; *открытые* и *закрытые* символы – эксперименты по денатурации и ренатурации соответственно.

Кинетика денатурации актина

Переход от нативного к инактивированному актину необратим. Поэтому в области концентраций GdnHCl от 0 до 0.8 М зависимости флуоресцентных характеристик актина от концентрации денатуранта носят квазистационарный характер. Это обстоятельство, а также то, что инактивированный актин, является ассоциатом и должен образовываться путем постепенного наращивания массы, определило необходимость изучения кинетики денатурации актина.

Существенно развернутый кинетический интермедиат, предшествующий образованию инактивированного актина. Характер кинетических зависимостей интенсивности флуоресценции, параметра A и анизотропии триптофановой флуоресценции (кривые с минимумом при концентрациях GdnHCl 1.2 – 1.5 М; рис. 3)

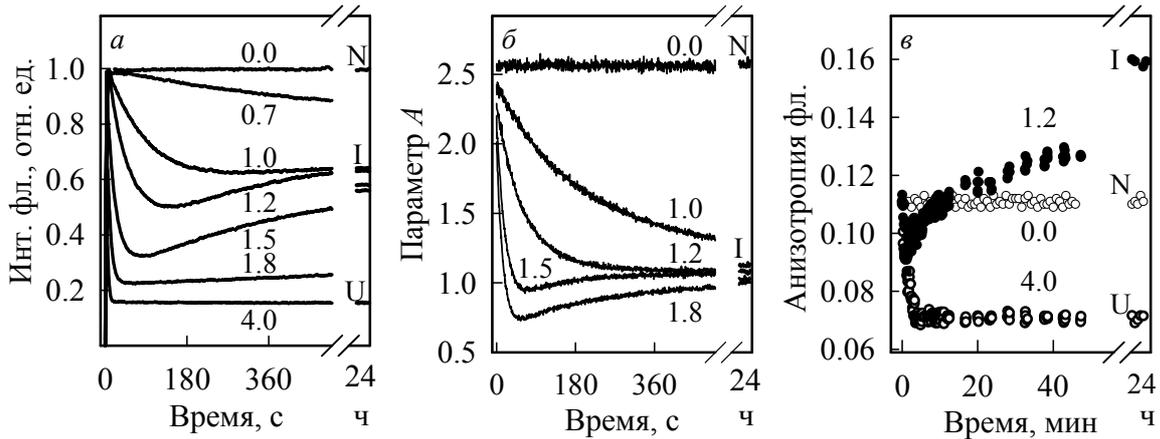
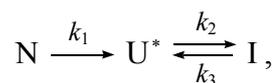


Рис. 3. Кинетические кривые денатурации актина под действием GdnHCl различной концентрации. (а) Изменение интенсивности собственной флуоресценции актина при $\lambda_{\text{рег}} = 320$ нм. (б) Изменение параметра A . (в) Изменение анизотропии флуоресценции. Числа – концентрация GdnHCl (М).

свидетельствует о том, что переход из нативного состояния в инактивированное осуществляется через некоторое промежуточное состояние, в котором интенсивность флуоресценции, параметр A и величина анизотропии флуоресценции меньше, чем в нативном и в инактивированном состояниях. Как известно, среди трех конформационных состояний актина (нативного, инактивированного и полностью развернутого), наименьшие значения интенсивности при длине волны 320 нм, величины параметра A и величины анизотропии флуоресценции имеет актин в полностью развернутом состоянии. На основании этого было сделано заключение, что переход от нативного к инактивированному актину осуществляется через стадию существенного разворачивания макромолекулы белка:



где k_i – константы скорости соответствующих процессов и U^* – существенно развернутый кинетический интермедиат, флуоресцентные свойства которого сходны со свойствами полностью развернутого актина.

В предположении справедливости предложенной кинетической схемы были определены константы скоростей k_i , и их зависимость от концентрации GdnHCl (рис. 4). Константа скорости k_3 , как и следовало ожидать, практически равна нулю. При небольших концентрациях GdnHCl величина k_2 значительно больше, чем величина k_1 . Значит, лимитирующей стадией при этих условиях является стадия разворачивания белка, в то же время после разворачивания молекулы быстро переходят в состояние инактивированного актина. С увеличением концентрации GdnHCl константа скорости k_1 увеличивается, а константа скорости k_2 уменьшается. Это приво-

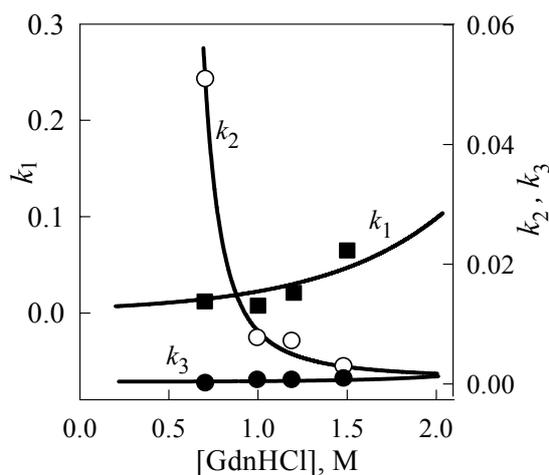


Рис. 4. Зависимость констант скоростей (k_i) денатурации актина от концентрации GdnHCl.

подтверждают справедливость заключения о том, что возникновению инактивированного актина предшествует стадия существенного разворачивания макромолекулы белка.

Кинетика образования инактивированного актина. Для изучения кинетики образования инактивированного актина, возможно, более удобно использовать характеристики, которые отражают изменение содержания только этого компонента системы и не зависят от наличия других компонент. Такой характеристикой может быть, в первую очередь, интенсивность флуоресценции АНС, и, в какой-то мере, – интегральная интенсивность и среднее время затухания фосфоресценции при комнатной температуре.

Флуоресценция АНС. Известно, что АНС не связывается с нативным и полностью развернутым актином, но эффективно связывается с инактивированным актином и интенсивно флуоресцирует в его присутствии в растворе. Есть все основания полагать, что краситель не будет связываться с вновь обнаруженным существенно развернутым кинетическим интермедиатом, предшествующим образованию инактивированного актина. А если это так, то кинетические зависимости интенсивности флуоресценции АНС при разворачивании актина GdnHCl будут отражать исключительно изменение содержания инактивированного актина в системе.

Кинетические зависимости изменения интенсивности флуоресценции АНС при переводе нативного актина в растворы с различным содержанием GdnHCl (рис. 5, а) свидетельствуют о том, что начальная скорость образования продукта, связы-

дит к накоплению существенно развернутого интермедиата на ранних стадиях в процессе денатурации и, как следствие, к появлению характерного минимума на кинетических кривых.

Проведено измерение кинетических зависимостей интенсивности флуоресценции актина при его разворачивании под действием мочевины и формамида различной концентрации, аналогичные тем, которые были выполнены при использовании в качестве денатуранта GdnHCl. Полученные данные

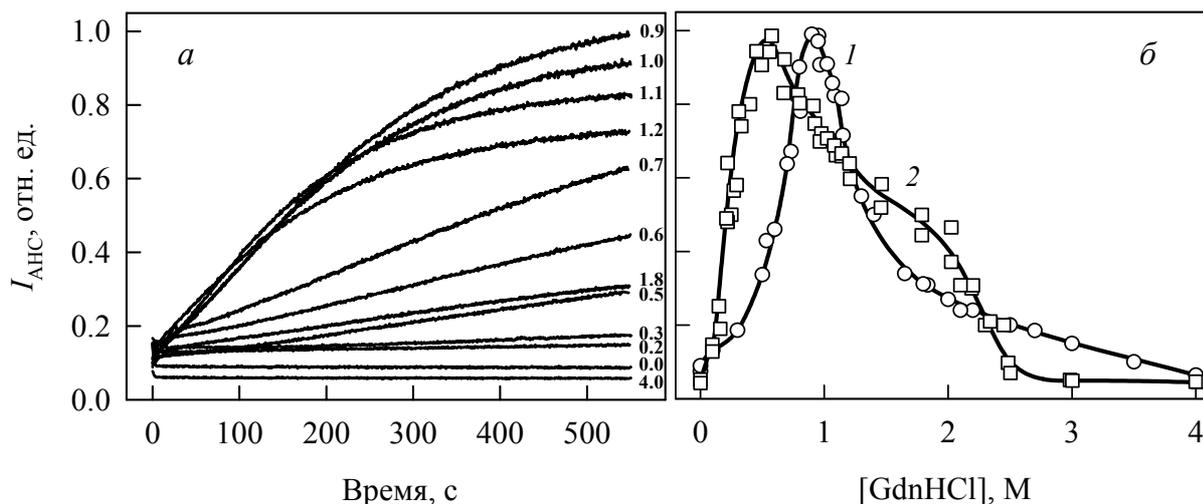
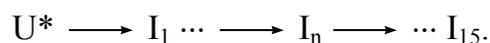


Рис. 5. Денатурация актина под действием GdnHCl, зарегистрированная путем измерения интенсивности гидрофобного зонда АНС. (а) Кинетические кривые денатурации актина под действием GdnHCl различной концентрации. Числа – концентрация GdnHCl (М); (б) квазистационарные зависимости интенсивности флуоресценции АНС от концентрации GdnHCl, измеренные через 10 мин (1) и через 24 ч (2) инкубации в растворах GdnHCl.

вающего АНС, возрастает по мере увеличения конечной концентрации GdnHCl от 0 до 1.2 М. Однако при концентрациях GdnHCl 1.0, 1.1 и 1.2 М скорость образования этого продукта вскоре существенно замедляется, так что через 10 мин после начала инкубации актина в растворах GdnHCl максимальная концентрация этого продукта имеет место при конечной концентрации 0.9 М GdnHCl. При меньших концентрациях этот процесс осуществляется дольше из-за низкой скорости превращения $N \rightarrow U^*$, а при более высоких – из-за замедления процесса $U^* \rightarrow I$. Зависимости интенсивности флуоресценции АНС от концентрации GdnHCl, зарегистрированные через 10 мин и через 24 ч после начала инкубации, существенно различаются (рис. 5, б).

Фосфоресценция при комнатной температуре. К настоящему времени установлено, что некоторые белки фосфоресцируют при комнатной температуре. Это обусловлено тем, что необходимая жесткость микроокружения триптофановых остатков в этих белках обеспечивается структурой самого белка (Strambini, 1989). Актин относится к числу белков, которые фосфоресцируют при комнатной температуре. Более того, при переходе от нативного актина к инактивированному значение среднего времени затухания $\langle \tau \rangle$ ФКТ возрастает в несколько раз (Мажуль и др., 2001). Очевидно, что существенно развернутый кинетический интермедиат не должен фосфоресцировать при комнатной температуре. Поэтому его присутствие в системе должно приводить к уменьшению интегральной интенсивности фосфорес-

ценции и не должно сказываться на среднем времени затухания флуоресценции, которое будет определяться только соотношением вкладов нативного и инактивированного актина в системе. Эти особенности флуоресценции актина в различных структурных состояниях были использованы для того, чтобы более подробно охарактеризовать процесс образования инактивированного актина. Если бы процесс образования инактивированного актина из существенно развернутого кинетического интермедиата являлся бы одностадийным процессом, то значение среднего времени жизни флуоресценции должно было бы быть равным значению соответствующей характеристики инактивированного актина во всем диапазоне изменения интегральной интенсивности от нуля (когда в системе присутствует в основном актин в состоянии U^*) до максимального значения. Однако значение этой характеристики возрастает симбатно с увеличением $I_{\text{инт}}$ (рис. 6), и это означает, что инактивированный актин – ассоциат, состоящий из 15 мономерных единиц (Kuznetsova et al., 1999a), – образуется из существенно развернутого состояния путем постепенного наращивания массы ассоциата:



Как и следовало ожидать, время достижения максимальных значений $I_{\text{инт}}$ и $\langle \tau \rangle$ ФКТ, отвечающих образованию инактивированного актина, сокращается при увеличении содержания белка в растворе (рис. 6).

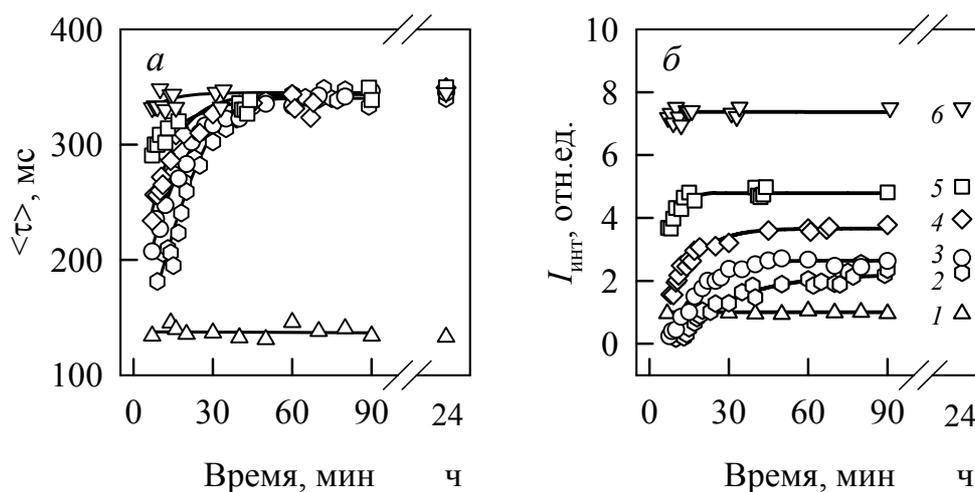


Рис. 6. Денатурация актина под действием 1.8 М GdnHCl. (а) Кинетика изменения среднего времени жизни ФКТ. (б) Кинетика изменения интегральной интенсивности ФКТ. Конечное содержание актина составляло 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 и 2.5 мг/мл, кривые 2, 3, 4, 5 и 6, соответственно. Кривая 1 – контроль (инкубация без GdnHCl).

Таким образом, данные, полученные с использованием метода ФКТ, подтвердили образование существенно развернутого кинетического интермедиата, предшествующего образованию инактивированного актина, и показали, что образование инактивированного актина из существенно развернутого кинетического интермедиата осуществляется путем постепенного наращивания массы образующегося ассоциата.

Специфические взаимодействия актина с GdnHCl

Для объяснения причины сложного характера зависимости интенсивности флуоресценции АНС от концентрации GdnHCl в растворах актина (см. рис. 5) были зарегистрированы аналогичные зависимости для ряда других характеристик, в том числе для интенсивности светорассеяния (рис. 7).

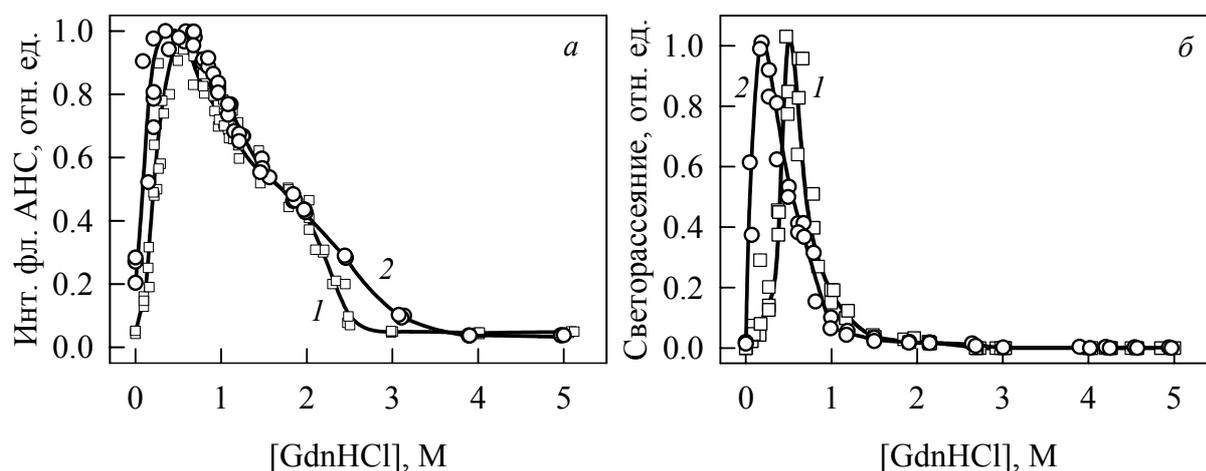


Рис. 7. Зависимость интенсивности флуоресценции АНС (а) и светорассеяния (б) от концентрации GdnHCl для исходно нативного и исходно инактивированного актина, кривые 1 и 2, соответственно.

Сходство характера зависимостей флуоресценции АНС и интенсивности светорассеяния для исходно нативного и исходно инактивированного актина заставляет искать причину обнаруженных эффектов в универсальном характере взаимодействия GdnHCl при его небольших концентрациях в растворе, с макромолекулами белка. Мы объяснили этот эффект взаимодействием групп NH_2 катионов GdnHCl (GuH^+) с группами C=O групп глутаминовой и аспарагиновой кислот, глутамина и аспарагина, локализованными на поверхности макромолекулы (рис.8). С ростом числа ионов GuH^+ , связанных с белком, увеличивается количество положительных групп на поверхности белка и при некоторой концентрации GdnHCl в целом исходно отрицательно заряженная макромолекула актина становится нейтральной. При

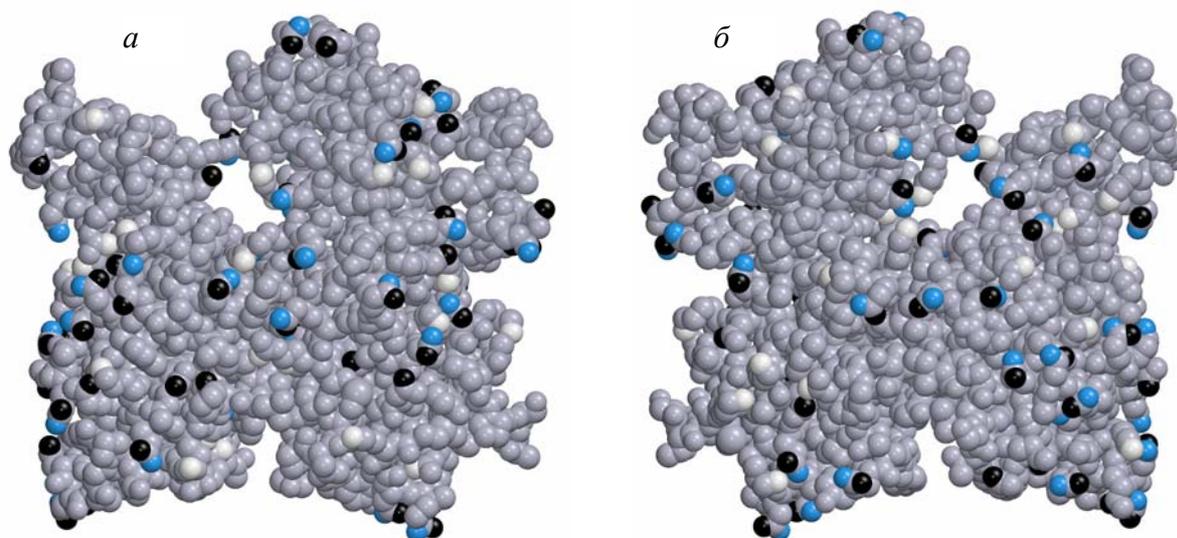


Рис. 8. Локализация отрицательно и положительно заряженных групп, а также атомов кислорода групп C=O на поверхности макромолекулы актина. Панели *a* и *б* отличаются друг от друга поворотом молекулы на 180° вокруг вертикальной оси. *Темно-серые сферы* – отрицательно заряженные атомы кислорода групп OE2 и OD2 глутаминовой и аспарагиновой аминокислот; *белые сферы* – положительно заряженные атомы азота групп NZ, NH1 и NE2 лизина, аргинина и гистидина; *черные сферы* – атомы кислорода групп C=O (OE1 Glu, OD1 Asp, OE1 Gln, OD1 Asn).

этом создаются условия агрегации макромолекул актина между собой. Это и является причиной возрастания светорассеяния и связывания молекул АНС, которые встраиваются между макромолекулами актина, образуя ассоциат. При дальнейшем увеличении концентрации GdnHCl число положительно заряженных групп на поверхности макромолекулы белка начинает превышать число отрицательно заряженных групп. Наличие положительно заряженных групп на поверхности макромолекулы препятствует их агрегации. То обстоятельство, что зависимости интенсивности флуоресценции АНС и интенсивности светорассеяния от концентрации GdnHCl для исходно нативного и исходно инактивированного актина имеют некоторые различия, позволяет предположить, что в состав агрегатов могут входить макромолекулы как нативного актина, так и инактивированного актина. Сделан вывод о том, что в растворах GdnHCl размер агрегатов инактивированного актина существенно зависит от концентрации денатуранта. Инактивированный актин представляет из себя монодисперсный ассоциат, состоящий из 15 мономерных единиц (Kuznetsova et al., 1999a), лишь в водном растворе в отсутствие GdnHCl.

Новая кинетическая схема процессов сворачивания – разворачивания актина

Для того, чтобы понять роль промежуточного состояния U^* в общей схеме процессов сворачивания–разворачивания актина необходимо было охарактеризо-

вать свойства актина в этом состоянии и ответить на вопрос, не идентично ли это состояние полностью развернутому состоянию U.

Свойства кинетического предшественника инактивированного актина.

Для выяснения природы кинетического интермедиата U^* , предшествующего образованию инактивированного актина, кинетические зависимости интенсивности флуоресценции, измеренные при длинах волн 320 и 365 нм, были использованы для построения параметрических зависимостей (рис. 9). Характер параметрической за-

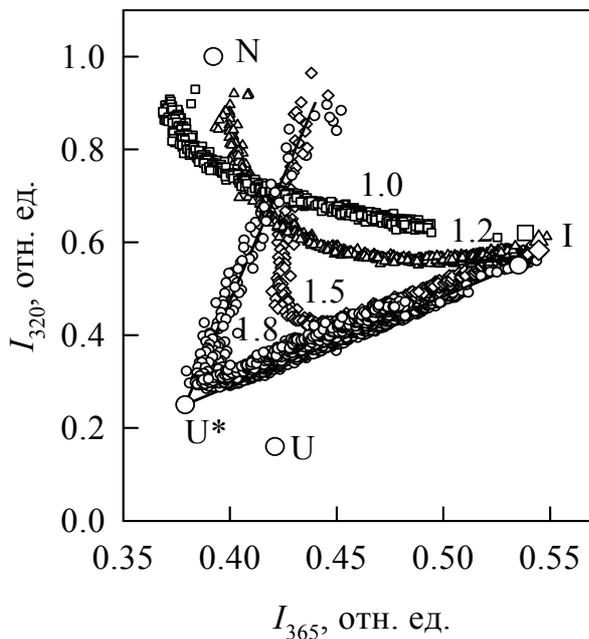


Рис. 9. Параметрические зависимости между интенсивностью флуоресценции I_{320} и I_{365} , характеризующие кинетику разворачивания нативного актина под действием GdnHCl. Параметр – время, прошедшее после добавления к нативному актину растворов GdnHCl различной концентрации. Числа – концентрация GdnHCl, (M). Длительность эксперимента 10 мин. Символы большего размера – результат измерений после инкубации растворов в течение 24 ч. За единицу принята интенсивность флуоресценции нативного актина при $\lambda_{\text{рег}} = 320$ нм. N, I, U^* , U – нативный, инактивированный, существенно развернутый и полностью развернутый актин.

висимости при денатурации актина под действием 1.8 M GdnHCl однозначно свидетельствует о существовании кинетического интермедиата между нативным и инактивированным актином. Точка на диаграмме, в которой пересекаются прямые, отвечающие процессу разворачивания нативного актина ($N \rightarrow U^*$) и процессу образования инактивированного актина из существенно развернутого состояния ($U^* \rightarrow I$), характеризует свойства кинетического интермедиата (U^*). Величина параметра A , для кинетического интермедиата U^* оказалась выше соответствующей величины для полностью развернутого актина. Этот результат позволил сделать заключение о том, что свойства кинетического интермедиата не идентичны свойствам полностью развернутого актина в 6M GdnHCl. Характер параметрических зависимостей между I_{320} и I_{365} для концентраций GdnHCl меньше чем 1.8 M свидетельствует о том, что в любой момент времени в растворе существует более чем две компоненты. Таким образом, характер параметрических зависимостей свидетельствует о том, что образование инактивированного актина происходит через стадию обра-

зования существенно развернутого белка, хотя время жизни этого состояния уменьшается с уменьшением конечной концентрации GdnHCl.

С использованием метода КД в дальней УФ-области спектра было показано, что обнаруженный интермедиат сохраняет (в отличие от полностью развернутого состояния) выраженную вторичную структуру. Показано также, что этот интермедиат не имеет (в отличие от инактивированного актина) гидрофобных кластеров, способных связывать АНС.

Быстрая кинетика. Несколько неожиданным результатом построения параметрических зависимостей явилось то обстоятельство, что зависимости, отвечающие процессам разворачивания актина под воздействием GdnHCl различной концентрации, исходят не из одной точки, соответствующей нативному белку (N), а из разных точек (см. рис. 9). Одно из возможных объяснений этого эффекта состоит в предположении существования быстрого конформационного превращения, которое невозможно выявить в кинетических экспериментах без применения специальной

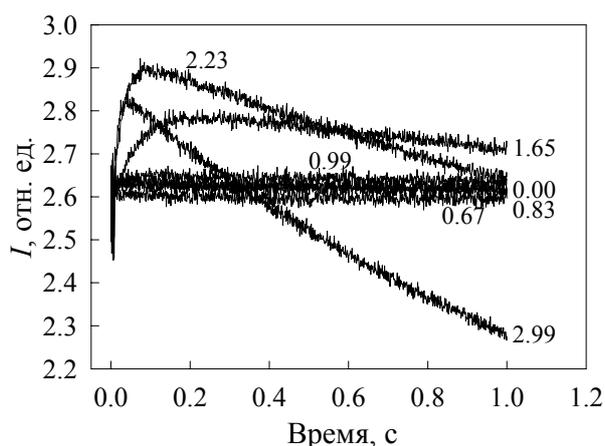


Рис. 10. Быстрая кинетика разворачивания актина под действием GdnHCl. Числа – концентрация GdnHCl (M).

аппаратуры. Для проверки этого предположения были выполнены эксперименты по изучению быстрой кинетики структурных превращений актина под действием GdnHCl различной концентрации (Рис. 10) с использованием оборудования стоп-флоу. Эти эксперименты подтвердили предположение о существовании интермедиата N*, предшествующего образованию существенно развернутого кинетического интермедиата U*.

Кинетика перехода инактивированный актин – полностью развернутый актин. Для более полного изучения процессов сворачивания – разворачивания актина было проведено изучение кинетики разворачивания инактивированного актина. Результаты стационарных экспериментов (Turoverov et al., 1999) свидетельствуют о том, что этот процесс обратим, и протекает в области концентраций GdnHCl от 1.8 до 3.5 M с серединой перехода при 2.5 M. Кинетические зависимости интенсивности флуоресценции при изменении концентрации GdnHCl от 1.8 до 4.0 M и от 4.0 до 1.8 M также доказывают обратимость перехода (рис. 11, а и б). Инактивированный актин не разворачивается полностью даже через 24 ч после его перевода в

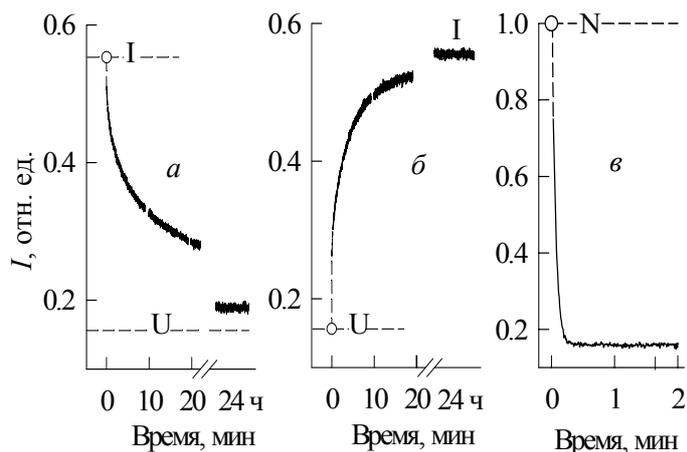


Рис. 11. Изменение интенсивности собственной флуоресценции актина при конформационном переходе инактивированный актин (I) – полностью развернутое состояние (U). (а) Переход I → U при изменении концентрации GdnHCl от 1.8 до 4.0 М; (б) переход U → I при изменении концентрации GdnHCl от 4.0 до 1.8 М; (в) денатурация нативного актина, под действием 4.0 М GdnHCl.

раствор в 4М GdnHCl (рис. 11, а),

в то время как нативный актин при тех же условиях полностью разворачивается через 10 с (рис. 11, в). Это связано с тем, что инактивированный актин представляет ассоциат, и необходимо некоторое время для того, чтобы этот ассоциат был разрушен. Следует отметить, что переход от полностью развернутого актина к инактивированному протекает быстрее, чем разворачивание инактивированного актина.

Нелинейный характер параметрических зависимостей между I_{320} и I_{365} (рис. 12) и немонотонный закон изменения интенсивности флуоресценции свидетельствуют о том, что переход от инактивированного актина к полностью развернутому состоянию и обратный процесс не являются одностадийными. По-видимому, переход от полностью развернутого состояния к инактивированному происходит через стадию образования существенно развернутого кинетического интермедиата (рис. 12; кривая 1).

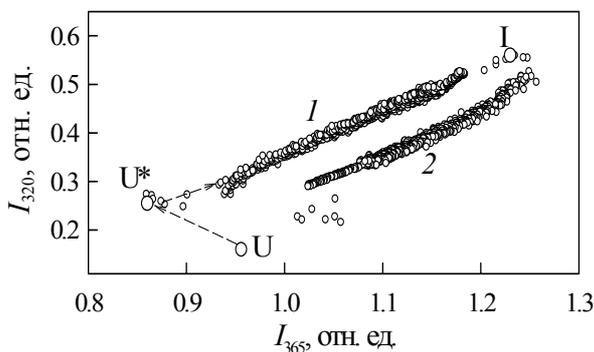
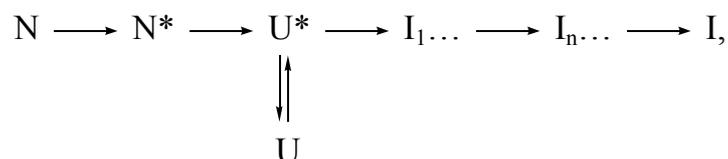


Рис. 12. Параметрические зависимости между интенсивностью флуоресценции I_{320} и I_{365} , характеризующие кинетику разворачивания инактивированного актина (1) и частичного сворачивания полностью развернутого актина (2), вызванных изменением концентрации GdnHCl от 1.8 до 4.0 М от 4.0 до 1.8 М соответственно. Параметр – время, прошедшее после изменения концентрации GdnHCl. За единицу принята интенсивность флуоресценции нативного актина при $\lambda_{\text{пер}}=320$ нм (на рисунке эта точка не показана).

На основании всех представленных выше данных была предложена следующая схема разворачивания актина под воздействием GdnHCl:



Согласно этой схеме, вновь обнаруженные кинетические интермедиаты N^* и U^* являются промежуточными состояниями на пути сворачивания–разворачивания актина, в то время как инактивированный актин, стабилизация структуры которого происходит за счет ассоциации частично-свернутых макромолекул белка, является результатом неправильного сворачивания белка.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что разворачивание актина проходит через образование двух вновь обнаруженных кинетических интермедиатов N^* и U^* , возникающих на ранних стадиях денатурации актина.
2. Показано, что существенно развернутый кинетический интермедиат U^* , предшествующий образованию инактивированного актина, имеет высокий уровень внутримолекулярной подвижности, но сохраняет элементы вторичной структуры и имеет несколько более коротковолновый, по сравнению с полностью развернутым состоянием, спектр флуоресценции.
3. Предложена и обоснована новая схема процессов сворачивания – разворачивания актина, согласно которой вновь обнаруженные кинетические интермедиаты N^* и U^* являются промежуточными состояниями на пути сворачивания – разворачивания актина, в то время как инактивированный актин образуется в результате ассоциации частично-свернутых денатурированных макромолекул белка. Последнее является причиной необратимости процесса разворачивания актина *in vitro*.
4. Показано, что в присутствии GdnHCl происходит агрегация инактивированного актина (агрегация ассоциатов), обусловленная изменением поверхностного заряда инактивированного актина при его взаимодействии с ионами GuH^+ .

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- Kuznetsova I.M., Biktashev A.G., Stepanenko O.V., Povarova O.I., Shavlovsky M.M., Turoverov K.K. 2001.* Inactivated state of actin develops from native one via completely unfolding of protein macromolecule. International symposium " Biological motility: new trends of research". Pushchino, p.89.
- Turoverov K.K., Verkhusha V.V., Shavlovsky M.M., Biktashev A.G., Povarova O.I., Kuznetsova I.M. 2002.* Kinetics of actin unfolding induced by guanidine hydrochloride. *Biochemistry.* 41: 1014-1019.
- Туроверов К.К., Шавловский М.М., Бикташев А.Г., Поварова О.И., Степаненко О.В., Кузнецова И.М. 2002.* Кинетика процессов сворачивания – разворачивания актина. Механизм возникновения и свойства инактивированного актина. III Съезд биохимического общества. Тезисы докладов. Санкт-Петербург, стр.526.
- Kuznetsova I.M., Stepanenko O.V., Stepanenko O.V., Povarova O.I., Biktashev A.G., Verkhusha V.V., Shavlovsky M.M., Turoverov K.K. 2002.* The place of inactivated actin and its kinetic predecessor in actin folding-unfolding. *Biochemistry.* 41: 13127-13132.
- Kuznetsova I.M., Povarova O.I., Stepanenko Olesia V., Stepanenko Olga V., Shavlovsky M.M. and Turoverov K.K. 2004.* Kinetics of formation and properties of on-pathway folding intermediates and misfolded monomeric and aggregated forms of actin. International symposium "Biological motility". Pushchino, p.90
- Поварова О.И., Кузнецова И.М., Туроверов К.К. 2004.* Что является причиной ряда аномальных явлений в растворах актина с низким содержанием гуанидингидрохлорида? III Съезд биофизиков России. Тезисы докладов. Воронеж, стр.84.
- Поварова О.И., Кузнецова И.М. и Туроверов К.К. 2005.* Новая схема процессов сворачивания – разворачивания и физико-химические свойства актина в различных структурных состояниях. *Цитология.* 47: 953-977.
- Мажуль В.М., Зайцева Е.М., Поварова О.И., Шавловский М.М., Кузнецова И.М. и Туроверов К.К. 2005.* Фосфоресценция при комнатной температуре интермедиатов сворачивания белков, а также аморфных агрегатов и амилоидных фибрилл, возникающих в результате неправильного фолдинга белков. *Цитология.* 47: 978-987.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Бурштейн Э.А.* 1976. Люминесценция белковых хромофоров. Сер. Биофиз, Т.7, ВИНТИ, Москва.
- Мажуль В.М., Зайцева Е.М., Шавловский М.М., Кузнецова И.М., и Туроверов К.К.* 2001. Триптофановая фосфоресценция при комнатной температуре нативного и инактивированного актина. *Биофизика* 46, 988-996.
- Туроверов К. К., Бикташев А. Г., Дорофеев А. В., Кузнецова И. М.* 1998. Комплекс аппаратных и программных средств для измерения спектральных, поляризационных и кинетических характеристик флуоресценции в растворе. *Цитология*. 40: 806-817.
- Altschuler G. M., Klug D.R., Willison K.R.* 2005. Unfolding energetics of G- α -Actin: a discrete intermediate can be re-folded to the native state by CCT. *J Mol. Biol.* Available online at www.sciencedirect.com.
- Bertazzon A., Tian G. H., Lamblin A., Tsong T. Y.* 1990. Enthalpic and entropic contributions to actin stability: calorimetry, circular dichroism and fluorescence study and effect of calcium. *Biochemistry*. 29: 291-298.
- Carrell R. W., Gooptu B.* 1998. Conformational changes and disease-serpins, prions and Alzheimer's. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 799-809.
- Fink A. L.* 1998. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold. Des.* 3: R9-23.
- Frankel S., Condeelis J., Leinwand L.* 1990. Expression of actin in *Escherichia coli*: Aggregation, solubilization, and functional analysis. *J. Biol. Chem.* 265: 17980-17987.
- Harper J. D., Lansbury P. T. Jr.* 1997. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 385-407.
- Hashimoto M., Masliah E.* 1999. Alpha-synuclein in Lewy body disease and Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 9: 707-720.
- Kabsch W., Mannherz H. G., Suck D., Pai E. F., Holmes H. C.* 1990. Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature*. 347: 37-44.
- Kelly J. W.* 1997. Amyloid fibril formation and protein misassembly a structural quest for insight into amyloid and prion diseases. *Structure* 5: 595-600.
- Kelly J. W.* 2000. Mechanisms of amyloidogenesis. *Nature Struct. Biol.* 7: 824-826.
- Koo E. H., Lansbury P. T. Jr, Kelly J. W.* 1999. Amyloid disease abnormal protein aggregation in neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 9989-9990.

- Kuznetsova I. M., Biktashev A. G., Khaitlina S. Yu., Vassilenko K. S., Turoverov K. K., Uversky V. N. 1999a.* Effect of self-association on the structural organization of partially folded proteins: inactivated actin. *Bioph. J.* 77: 2788-2800.
- Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Uversky V. N. 1999b.* Inactivated actin, and aggregate comprised of partially-folded monomers, has a overall native-like packing density. *Protein Peptide Lett.* 6: 173-178.
- Lehrer S. L., Kerwar G. 1972.* Intrinsic fluorescence of actin. *Biochemistry.* 11: 1211-1217.
- Lewis M.S., Maruyama K., Carroll W.R., Kominz D.R., Laki K. 1963.* Physical properties and polymerization reactions of native and inactivated G-actin. *Biochemistry.* 2: 34-39.
- Pardee J. D., Spudich J. A. 1982.* Purification of muscle actin. *Meth. Enzymol.* 85: 164-181.
- Rees M. K., Young M. 1967.* Studies on the isolation and molecular properties of homogeneous globular actin. Evidence for a single polypeptide chain structure. *J. Biol. Chem.* 242: 4449-4458.
- Schuler H., Lindberg U., Schutt C.E., Karlsson R. 2000.* Thermal unfolding of G-actin monitored with the DNase I-inhibition assay. Stabilities of actin isoforms. *Eur. J. Biochem.* 267: 476-486.
- Speed M. A., Wang D. I., King J. 1996.* Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition. *Nat. Biotechnol.* 14: 1283-1287. 16.
- Strambini G.B. 1989.* Tryptophan phosphorescence as a monitor of protein flexibility *J. Mol. Liq.* 42: 155-163.
- Turoverov K. K., Khaitlina S. Yu., Pinaev G. P. 1976.* Ultra-violet fluorescence of actin. Determination of native actin content in actin preparations. *FEBS Lett.* 62: 4-7.
- Turoverov K. K., Biktashev A. G., Khaitlina S. Yu., Kuznetsova I. M. 1999.* The structure and dynamics of partially folded actin. *Biochemistry.* 38: 6261-6269.
- Wetzel R. 1992.* in *Protein Engineering. A Practical Approach* (Rees A. R., Sternberg A. R., Wetzel R., Eds.) pp 191-219, IRL Press, Oxford.