

На правах рукописи

КУЗНЕЦОВА
Ирина Михайловна

МЕХАНИЗМЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И СВОЙСТВА ПРОМЕЖУТОЧНЫХ,
НЕПРАВИЛЬНО СВЕРНУТЫХ И АГРЕГИРОВАННЫХ ФОРМ БЕЛКОВ

03.00.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург
2006

Работа выполнена в Институте цитологии РАН

НАУЧНЫЙ КОНСУЛЬТАНТ:

Доктор физико-математических наук
ТУРОВЕРОВ Константин Константинович

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Доктор биологических наук, профессор
ВОРОБЬЕВ Владимир Иосифович

Доктор биологических наук, профессор
ЛЕВИЦКИЙ Дмитрий Иванович,

Доктор биологических наук, профессор
ПЕРМЯКОВ Евгений Анатольевич

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

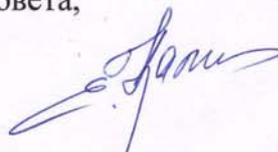
Петербургский институт ядерной физики
им. Б.П.Константинова РАН

Защита состоится "03" марта 2006 года в 13 часов на заседании Диссертационного совета Д.002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4, факс 7(812) 297-03-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН (194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4).

Автореферат разослан "02" февраля 2006 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Е. В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Вопрос о том, как белки сворачиваются в уникальное, компактное, высокоорганизованное, функционально-активное состояние, является одним из центральных вопросов современной молекулярной и клеточной биологии. По современным представлениям аминокислотная последовательность каждого конкретного белка, возникшая в результате эволюционного отбора, такова, что в ней запрограммирована структура нативного состояния, путь ее достижения и существование свободноэнергетического барьера между нативным и денатурированным состояниями белка. Последнее означает, что макромолекула белка может находиться либо в нативном, либо в денатурированном состоянии. При этом все макромолекулы нативного белка идентичны, если не считать различий структуры, обусловленных броуновским движением входящих в их состав атомов. Денатурированных состояний может быть несколько. Идентичность всех молекул каждого конкретного белка в нативном состоянии исключительно важна для его правильного функционирования. Каждому денатурированному состоянию отвечает ансамбль молекул, отличающихся друг от друга по структуре.

Хотя в клетке имеется много факторов, вовлеченных в процесс правильного сворачивания полипептидной цепи (ферменты, ответственные за цис-транс изомеризацию пролина и образование "правильных" дисульфидных связей, и шапероны), ни один из этих факторов не несет той информации, которая необходима для приобретения полипептидной цепью уникальной нативной структуры, и присутствие этих факторов не всегда является необходимым условием правильного сворачивания белка. Многие белки могут правильно сворачиваться из полностью развернутого состояния *in vitro*. Несмотря на огромное число работ, посвященных фолдингу белков, вопрос о том, каким образом в аминокислотной последовательности белка закодирована его уникальная третичная структура (то, что называют иногда второй частью генетического кода), остается открытым. Основным подходом к решению проблемы фолдинга белков является изучение процессов их разворачивания–сворачивания и характеристика возникающих при этом промежуточных денатурированных частично-свернутых и неправильно свернутых состояний. Большинство исследований по изучению фолдинга белков выполнено на небольших однодоменных белках, для которых процесс разворачивания является обратимым. Актуальным является изучение путей разворачивания–сворачивания более сложных мультидоменных белков, выяснение вопроса о том, насколько одностадийность и обратимость разворачивания коррелирует

Принятые сокращения: АНС – 1-анилинонафталин-8-сульфонат, CD – круговой дихроизм, GdnHCl – гуанидинхлорид, ФКТ – флуоресценция при комнатной температуре.

с размером и мультидоменностью белка, а также то, насколько путь разворачивания, последовательность образования и число возникающих денатурированных частично-свернутых состояний белка зависит от характера денатурирующего воздействия.

Долгое время процессам агрегации белков при фолдинге не уделялось должного внимания. В настоящее время совершенно очевидно, что изучение агрегации белков в процессе фолдинга имеет не только фундаментальное научное, но и большое практическое значение. Оказалось, что биотехнологический процесс получения рекомбинантных белков очень часто осложнен возникновением аморфных агрегатов, накапливающихся в телах включения [1-3]. Возникновение упорядоченных агрегатов – амилоидных фибрилл, является причиной так называемых "конформационных болезней" – многих тяжелых заболеваний, таких как нейродегенеративные болезни Альцгеймера и Паркинсона, прионные заболевания и др. [4 -12].

Успех исследований всегда в значительной степени зависит от наличия хорошо отработанных и адекватных методов. Флуоресцентный краситель тиофлавин Т специфически взаимодействует только с белками в состоянии амилоидных фибрилл, и при этом интенсивность его флуоресценции возрастает на несколько порядков. Благодаря этим уникальным свойствам тиофлавин Т является прекрасным средством для диагностики возникновения амилоидных фибрилл в различных тканях и органах и, кроме того, для изучения фибриллогенеза и свойств амилоидных фибрилл *in vitro* [13, 14, 15]. Однако свойства этого красителя остаются мало изученными (см. Воробай и др., 2003)¹. В связи с этим представлялось чрезвычайно актуальным выполнить исследования спектральных свойств этого красителя, которые бы позволили понять причины существенного (на несколько порядков) увеличения интенсивности флуоресценции тиофлавина Т при его инкорпорации в амилоидные фибриллы.

Цель и задачи исследования. Цель работы состояла в изучении особенностей разворачивания–сворачивания однодоменных и двухдоменных белков и свойств возникающих при этом промежуточных состояний, а также агрегированных форм белков, приводящих к необратимости процесса их денатурации. Для достижения поставленной цели необходимо было решить ряд конкретных задач:

1) Выяснить, насколько одностадийность и обратимость разворачивания–сворачивания коррелирует с размером и мультидоменностью белка. С этой целью изучить процессы разворачивания–сворачивания ряда двухдоменных белков (глобулярного актина, креатинкиназы, дисульфидизомеразы С, глутамин-связывающего белка) и однодоменного белка – карбоангидразы II;

¹ Здесь и далее в круглых скобках приводятся ссылки на работы, представленные в списке публикаций по теме диссертации.

- 2) Выяснить, насколько путь разворачивания каждого конкретного белка, последовательность и число возникающих денатурированных частично-свернутых состояний зависит от характера денатурирующего воздействия;
- 3) Изучить кинетику разворачивания–сворачивания глобулярного актина, механизмы образования инактивированного актина, охарактеризовать свойства кинетических интермедиатов, возникающих в процессе разворачивания этого белка;
- 4) Исследовать, на примере глутамин-связывающего белка, роль лигандов в стабилизации структуры белков к денатурирующему воздействию GdnHCl и нагревания;
- 5) Выяснить, на примере флуоресцентных белков EGFP, DsRed и их мутантных форм, особенности процессов разворачивания–сворачивания белков типа β -бочонка и роль четвертичной структуры в стабилизации белков этого класса;
- 6) Осуществить разработку новых методических подходов для изучения процессов разворачивания–сворачивания белков и для исследования свойств возникающих при этом интермедиатов и агрегированных форм белков и, в частности, выяснить причины существенного возрастания квантового выхода флуоресценции тиофлавина Т при взаимодействии с амилоидными фибриллами.

Научная новизна. Ряд результатов, полученных при изучении процессов разворачивания–сворачивания конкретных белков, получен впервые, в частности, впервые установлено одностадийное, обратимое разворачивание дисульфидизомеразы С, мультстадийное, но обратимое разворачивание креатинкиназы и глутамин-связывающего белка под действием GdnHCl. Физико-химическими методами впервые прямо показаны изменения структуры креатинкиназы под воздействием небольших концентраций GdnHCl (0.1 M), ранее обнаруженные по изменению каталитической активности фермента. Предложена и обоснована принципиально новая схема процессов разворачивания–сворачивания актина, учитывающая существование вновь обнаруженных кинетических интермедиатов N* и U*, а также то, что инактивированный актин, ранее считавшийся интермедиатом на пути разворачивания белка, на самом деле является монодисперсным ассоциатом, образование которого препятствует правильному сворачиванию белка *in vitro*. Впервые на примере инактивированного актина показано, что GdnHCl может, при определенных условиях, вызывать агрегацию белков. Впервые флуоресцентные свойства тиофлавина Т (низкий квантовый выход в водных и спиртовых растворах и существенное возрастание квантового выхода при инкорпорации в амилоидные фибриллы) ассоциированы с принадлежностью этого красителя к классу соединений, известных как молекулярные роторы.

Основные положения, выдвигаемые на защиту.

1. Путь разворачивания, последовательность образования и число возникающих денатурированных частично-свернутых состояний каждого конкретного белка не зависят от характера денатурирующего воздействия и стабилизации структуры белка при связывании лиганда.
2. Способность белков к одностадийному обратимому разворачиванию нельзя однозначно связывать с их размером и мультидоменностью.
3. Вновь обнаруженные промежуточные состояния актина N* и U* являются кинетическими интермедиатами на пути разворачивания–сворачивания актина, в то время как инактивированный актин, ранее считавшийся промежуточным состоянием белка, на самом деле является монодисперсным ассоциатом, образование которого препятствует правильному сворачиванию белка *in vitro*. На основании этих данных предложена принципиально новая схема процессов разворачивания–сворачивания глобулярного актина.
4. Четвертичная структура зеленых и красных флуоресцентных белков EGFP (зеленого мономера), zFP506 (зеленого тетрамера), mRFP1 (красного мономера), “dimer2” (красного димера) и DsRed1 (красного тетрамера) не является единственным фактором, определяющим различия в их стабильности.
5. Химический денатурант GdnHCl, часто используемый при изучении фолдинга белков, может, при определенных условиях, вызывать агрегацию белков.
6. Причиной существенного возрастания квантового выхода флуоресценции тиофлавина T при его инкорпорации в амилоидные фибриллы является жесткость окружения, препятствующая повороту бензтиазольного и аминобензольного колец друг относительно друга в возбужденном состоянии. Флуоресцентные свойства тиофлавина T характерны для соединений, относящихся к классу молекулярных роторов.

Теоретическая и практическая значимость. Сформулированная на основе полученных в работе экспериментальных результатов концепция универсального характера механизма разворачивания–сворачивания каждого конкретного белка, согласно которой путь разворачивания, последовательность образования и число возникающих денатурированных частично-свернутых состояний белка не зависят от характера денатурирующего воздействия, а также заключение о том, что способность белков к одностадийному и обратимому разворачиванию нельзя однозначно связывать с их размером и мультидоменностью обогащают представления о процессах разворачивания–сворачивания белков и могут быть использованы при дальнейших исследованиях процесса их фолдинга.

Обнаружение и характеристика ранее неизвестных интермедиатов, а также выяснение роли инактивированного актина в процессе разворачивания–сворачивания

могут являться основой для понимания процессов фолдинга актина *in vivo* и для проведения дальнейших исследований, направленных на поиск путей ренатурации полностью развернутого актина *in vitro* с участием факторов, способствующих сворачиванию актина в клетке (шаперонина ССТ и префолдина).

Обнаруженную на примере инактивированного актина способность GdnHCl при определенных условиях вызывать агрегацию белков следует учитывать в дальнейшем при использовании GdnHCl в качестве денатуранта в работах по изучению фолдинга белков.

Механизм существенного возрастания интенсивности флуоресценции тиофлавина Т при его инкорпорации в амилоидные фибриллы объяснен на основании представления о том, что тиофлавин Т относится к классу молекулярных роторов. Этот результат имеет существенное значение при проведении работ по исследованию фибриллогенеза и изучению свойств амилоидных фибрилл.

Введен в практику исследований фолдинга белков метод, основанный на параметрическом представлении экспериментальных данных, предложенный еще в 1975 г. Бурштейном [16-17], но долгое время практически не использовавшийся. Метод уже широко используется не только в нашей Лаборатории, но и в других лабораториях (см. например, [18-19]).

Результаты работы используются при проведении лекционно-практических занятий для студентов Кафедры биофизики СПбГПУ.

Апробация работы. Материалы работы были представлены на 15 Международном симпозиуме биохимиков и молекулярных биологов стран Азии и Океании (FAOVMB) "Биохимия и молекулярная биология 21 века" (Пекин, Китай, 2000); Международных симпозиумах "Биологическая подвижность: новые направления исследований" (Пушино 2001, 2004); 9-й Международной конференции по спектроскопии биологических молекул (Прага, Чехия, 2001); Международных научных конференциях "Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем" (Минск, Беларусь, 2002, 2004); III Съезде биохимического общества (Санкт-Петербург, 2002); V Съезде белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, Беларусь, 2002); Национальной итальянской конференции по биохимии (Рим, Италия, 2003), III Съезде биофизиков России (Воронеж, 2004), II Санкт-Петербургской конференции молодых ученых "Современные проблемы науки о полимерах" (Санкт-Петербург, 2006, пленарный доклад).

Финансовая поддержка работы. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП "Материаловедение и диагностика в передовых технологиях" при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 99-04-39106 ГФЕН-Китай, 00-04-49224, 00-04-81082 Бел, 01-04-49308, 02-04-39009

ГФЕН-Китай, 02-04-81013 Бел, 02-04-81018 Бел, 04-04-49290), Программы РАН "Молекулярная и клеточная биология", COBAS, INT-0002341(USA), INTAS (грант 01-2347), NATO Collaborative Linkage Grant PST.NR.CLG 981025 (Italy).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 44 работы, из них 28 статей в рецензируемых журналах (11 – в отечественных и 17 – в международных журналах), а также тезисы 16 докладов на всероссийских и международных конференциях, совещаниях и съездах.

Структура диссертации. Диссертация состоит из Введения, четырех Глав, Выводов и Списка цитируемой литературы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во введении сформулированы цели и задачи исследований, обоснована их актуальность, приводятся основные положения, выносимые на защиту, рассмотрен вопрос о новизне, теоретической и практической значимости сделанных выводов.

Глава 1. Современные представления о процессах фолдинга белков

В этой главе дан краткий обзор современных представлений о фолдинге белков *in vivo* и *in vitro*. Рассмотрена роль шаперонов при фолдинге белков в клетке, особое внимание уделено роли АТФ-зависимых шаперонов Hsp70 и шаперонина ССТ в клетках эукариот. Обсуждаются различные модели сворачивания белка *in vitro* (модель "нуклеации – роста", "стадийного сворачивания" и модель "энергетической воронки"), роль промежуточных денатурированных частично-свернутых состояний белков и переходного состояния в образовании нативного белка. Рассмотрены механизмы возникновения агрегированных форм белков и, в частности, амилоидных фибрилл (Кузнецова и др., 2005a).

Глава 2. Материалы и методы

В этой главе дано краткое описание использованных в работе материалов и методов. Сведения о новых собственных методических разработках, использованных при проведении исследований, а также о тех результатах работы, учет которых может быть полезным при проведении исследований процессов разворачивания–сворачивания белков в дальнейшем, представлены в Главе 4.

Глава 3. Факторы, определяющие стабильность и особенности процессов разворачивания–сворачивания однодоменных и двухдоменных белков

В этой главе приведены результаты исследования процессов разворачивания–сворачивания ряда двухдоменных белков: глутамин-связывающего белка, дисульфид-

дизомеразы С, актина и креатинкиназы. Цель этих исследований состояла в том, чтобы выявить особенности разворачивания–сворачивания этого класса белков и, в частности, рассмотреть вопрос о том, насколько одностадийность и обратимость разворачивания коррелирует с размером, мультидоменностью и наличием лигандов, стабилизирующих белок. В этой же главе, на примере карбоангидразы II, показана возможность мультистадийного необратимого разворачивания белка, имеющего однодоменную структуру. Результаты исследования процессов разворачивания–сворачивания карбоангидразы II интересны также в связи с тем, что при переходе этого белка в состояние расплавленной глобулы проявляется эффект агрегирующего действия GdnHCl (см. раздел 4.4). Представлены также результаты сравнительного изучения устойчивости к денатурирующему воздействию GdnHCl ряда зеленых и красных флуоресцентных белков, отличающихся по их принадлежности к различным олигомерным формам: мономера (EGFP) и тетрамера (zFP506) зеленого флуоресцентного белка, мономера (mRFP1), димера ("dimer 2") и тетрамера (DsRed1) красного флуоресцентного белка предпринятые для выяснения роли четвертичной структуры в стабилизации белков этого класса.

3.1. Обратимое разворачивание глутамин-связывающего белка. Роль лиганда в стабилизации структуры. Глутамин-связывающий белок из *E. coli* относится к обширному классу двухдоменных лиганд-связывающих белков периплазмы, участвующих в процессе активного транспорта различных молекул через цитоплазматическую мембрану. Все белки этого класса имеют сходную структуру. Они состоят из двух глобулярных доменов, между которыми в глубокой щели расположен сайт связывания лиганда (рис.3.1.1, вставки).

Равновесные зависимости интенсивности триптофановой флуоресценции и параметра A , характеризующего положение спектра флуоресценции, от концентрации GdnHCl свидетельствуют о существовании по крайней мере двух переходов в области концентраций от 0 до 3 М GdnHCl (рис. 3.1.2, а). Первый переход начинается при 0.2 М и заканчивается при 0.7 М, второй – при 1.4 М и заканчивается при 2.1 М GdnHCl. В то же время величина анизотропии флуоресценции остается неизменной вплоть до 1.4 М GdnHCl, т.е. до начала второго перехода (рис. 3.1.2, б).

Параметрическое представление результатов стационарных измерений зависимости интенсивностей флуоресценции I_{320} и I_{365} от концентрации GdnHCl показало существование двух промежуточных состояний при разворачивании глутамин-связывающего белка: $N \rightleftharpoons I_1 \rightleftharpoons I_2 \rightleftharpoons U$ (рис.3.1.1). Существенное увеличение флуоресценции АНС в области первого перехода (рис.3.1.2, в) можно связать с возникновением состояния типа "расплавленной глобулы". Хотя при переходе $N \rightleftharpoons I_1$ наблюдается уменьшение эллиптичности в дальней УФ-области спектра, в состоянии

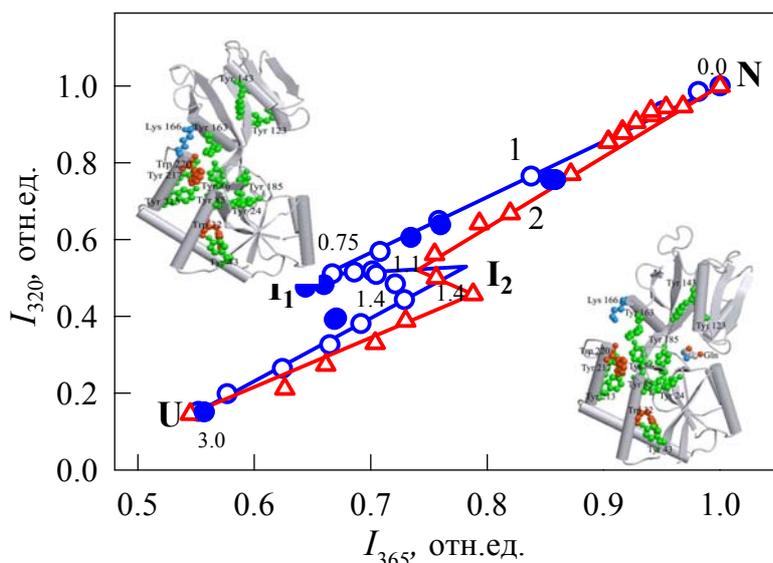


Рис. 3.1.1. Параметрические зависимости между интенсивностями флуоресценции, измеренными при длинах волн регистрации 320 нм (I_{320}) и 365 нм (I_{365}), характеризующие процесс разворачивания глутамин-связывающего белка (кривая 1, открытые символы) и его комплекса с глутамином (кривая 2, открытые символы) под действием GdnHCl. Параметр – концентрация GdnHCl. Закрытые символы отвечают процессу ренатурации глутамин-связывающего белка. Числа – концентрации GdnHCl.

Вставки: Пространственная структура глутамин-связывающего белка (левый верхний угол) и его комплекса с глутамином (правый нижний угол).

Показаны триптофановые остатки, тирозиновые остатки; и Lys 166, входящий в состав микроокружения Trp 220, и Gln (сферы). Образование комплекса GlnBP/Gln приводит к схлопыванию макромолекулы белка вокруг Gln и к закрытию щели. Использованы данные Protein Data Bank [20], файлы 1GGG.ent [21] и 1WDN.ent [22]. При подготовке рисунка использованы графические программы VMD [23] и Raster 3D [24].

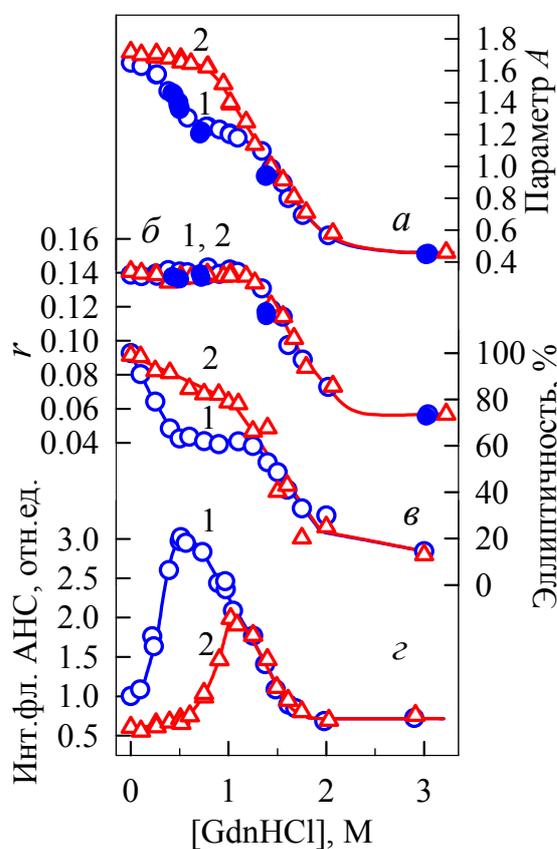


Рис. 3.1.2. Конформационные переходы глутамин-связывающего белка (кривые 1) и его комплекса с глутамином (кривые 2) под действием GdnHCl.

a – изменение параметра $A = I_{320}/I_{365}$, $\lambda_{\text{возб}} = 297$ нм; b – изменение анизотропии флуоресценции, $\lambda_{\text{возб}} = 297$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 365$ нм; c – изменение эллиптичности при 222 нм; d – изменение интенсивности флуоресценции АНС, $\lambda_{\text{возб}} = 365$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 480$ нм. Открытые символы – разворачивание, закрытые

I_1 сохраняется выраженная вторичная структура (рис.3.1.2, в). Несмотря на сложный характер разворачивания глутамин-связывающего белка под действием GdnHCl, его денатурация полностью обратима (рис.3.1.1 и 3.1.2).

Так как глутамин-связывающий белок является двухдоменным, нельзя не учитывать возможность того, что домены разворачиваются последовательно. В то же время, переход $N \rightarrow I_1$ нельзя объяснить разворачиванием малого домена (который не имеет триптофановых остатков), так как он сопровождается существенными изменениями флуоресцентных характеристик. С помощью метода FTIR была показана более низкая термочувствительность α -спиралей белка по сравнению с β -листами [25]. Возможно, α -спирали глутамин-связывающего белка также менее устойчивы к денатурирующему действию GdnHCl. Таким образом, мы можем предположить, что в нашем случае, переход $N \rightarrow I_1$ сопровождается разворачиванием α -спиралей, тогда как переход $I_1 \rightarrow I_2$ связан с разрушением β -листов.

Связывание лиганда приводит к тому, что изменения в структуре белка начинаются при гораздо больших концентрациях GdnHCl. Создается впечатление, что разворачивание комплекса происходит с образованием лишь одного (второго) промежуточного состояния (рис. 3.1.2). Параметрическая зависимость, построенная для комплекса белка с лигандом, однако, однозначно свидетельствует о том, что разворачивание комплекса происходит по такому же сценарию с образованием двух промежуточных состояний, что и для глутамин-связывающего белка. Таким образом, разворачивание глутамин-связывающего белка под действием GdnHCl является трехстадийным и обратимым. Связывание лиганда (Gln) приводит к тому, что структура становится более устойчивой к денатурирующему действию GdnHCl. Это, в свою очередь, приводит к кооперативному разворачиванию структуры по достижении соответствующей концентрации денатуранта (Степаненко и др., 2005а; Staiano et al., 2005).

3.2. Множественные денатурированные частично-свернутые состояния креатинкиназы. Креатинкиназа, относящаяся к классу фосфотрансфераз, играет важную роль в быстрой регенерации АТФ в клетках. Цитоплазматическая креатинкиназа из мышц кролика – димер. Мономер белка состоит из двух доменов: α -спирального N-концевого домена из 100 аминокислотных остатков и большого C-концевого домена из 250 аминокислотных остатков, соединенных между собой длинным линкерным участком (рис.3.2.1). Интерес к исследованию креатинкиназы был обусловлен тем, что изменение ферментативной активности этого белка [29] начинается при концентрациях денатурирующих агентов значительно меньших чем те, при которых были зарегистрированы изменения структуры фермента физико-химическими методами. Поэтому при изучении процессов разворачивания–сворачивания предполагалось обратить особое внимание на изменения структуры белка при малых концентрациях

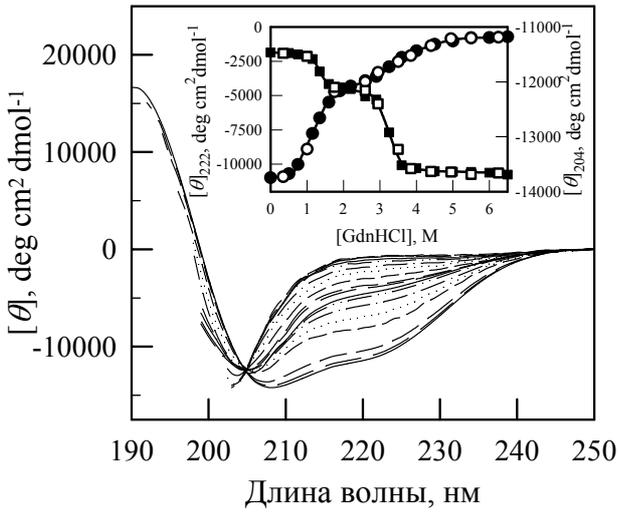


Рис. 3.2.4

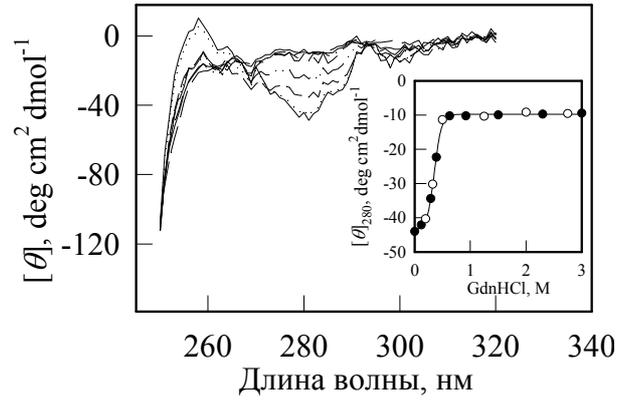


Рис. 3.2.3

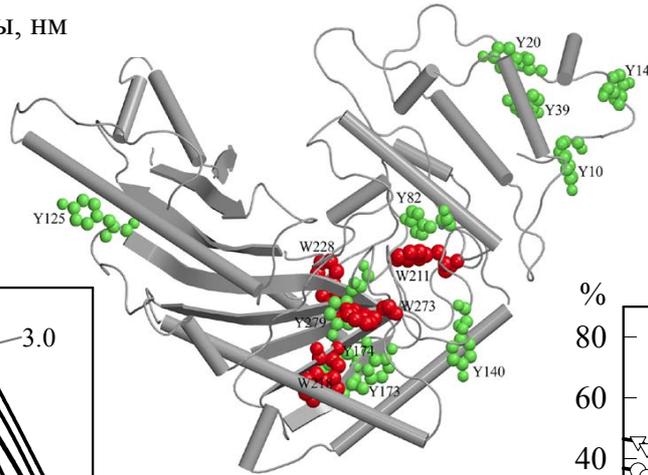


Рис. 3.2.1

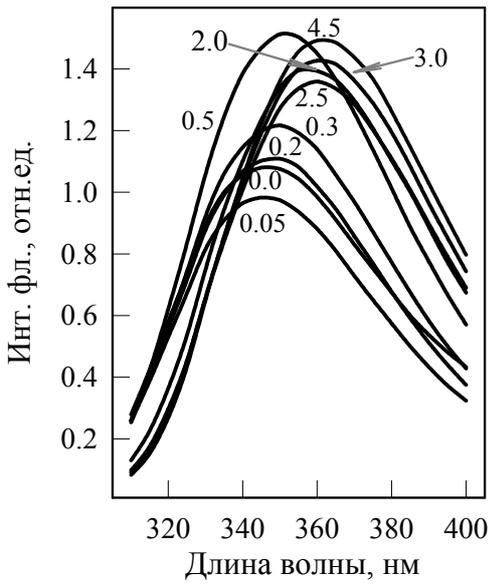


Рис. 3.2.2

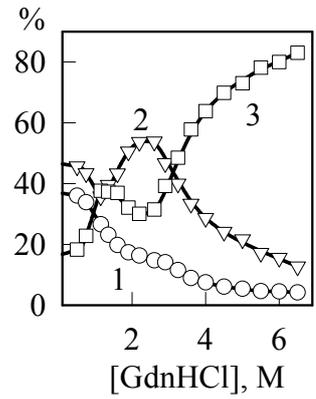


Рис. 3.2.7

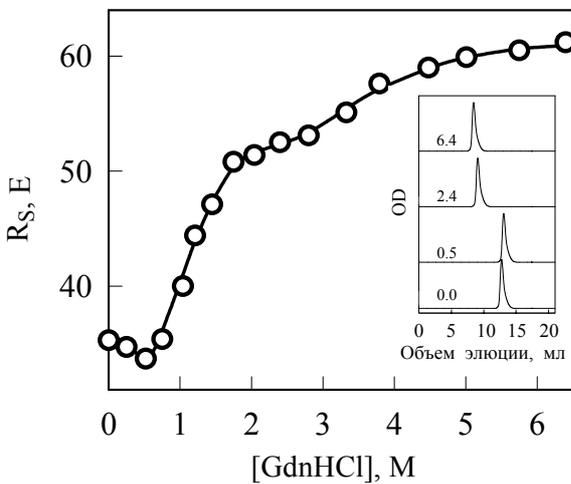


Рис. 3.2.5

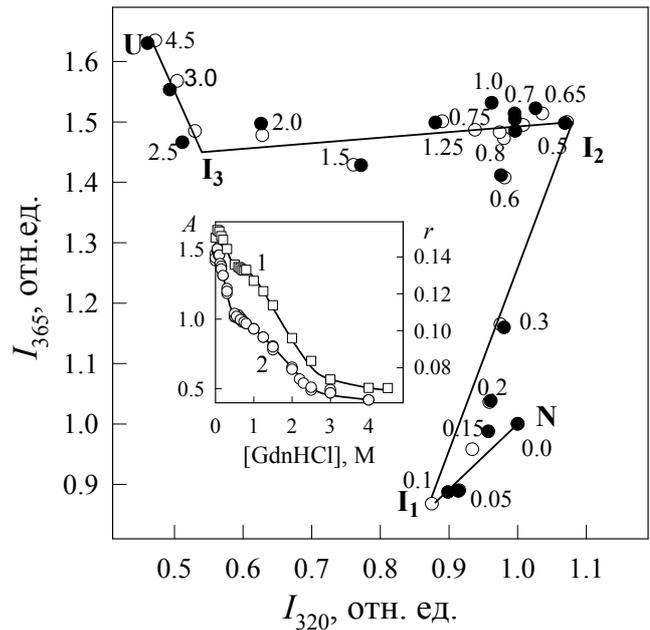


Рис. 3.2.6

Рис. 3.2.1. Пространственная структура макромолекулы креатинкиназы. Показана локализация триптофановых и тирозиновых остатков. Используются данные Банка белковых структур [20], файл 2CRK.ent [28]. Для построения изображений использовали графические программы VMD [23] и Raster3D [24].

Рис. 3.2.2. Спектры флуоресценции креатинкиназы при различных концентрациях GdnHCl. $\lambda_{\text{возб}} = 297\text{нм}$. Числа – концентрации GdnHCl.

Рис. 3.2.3. Изменение спектра CD креатинкиназы в ближней УФ-области при денатурации GdnHCl. Спектры измерены при 0.00, 0.50, 0.75, 1.15, 1.35, 1.60, 1.90, 2.20, 2.60, 2.90, 3.25, 3.60, 4.00, 4.50, 5.00, 5.50, 6.00 и 6.50 М GdnHCl. Вставка: зависимость величины эллиптичности при 222 нм от концентрации GdnHCl. Закрытые символы – денатурация, открытые – ренатурация.

Рис. 3.2.4. Изменение спектра CD креатинкиназы в дальней УФ-области при денатурации GdnHCl. Спектры измерены при 0.00, 0.12, 0.29, 0.39, 0.49, 0.63, 0.92, 1.50 и 2.30 М GdnHCl.

Вставка: зависимость величины эллиптичности при 280 нм от концентрации GdnHCl. Закрытые символы – денатурация, открытые – ренатурация.

Рис. 3.2.5. Изменение гидродинамических размеров креатинкиназы под действием GdnHCl. Вставка: характерные профили элюции. Числа - концентрации GdnHCl.

Рис. 3.2.6. Параметрическая зависимость между интенсивностями флуоресценции креатинкиназы, измеренными при 320 нм (I_{320}) и 365 нм (I_{365}), построенная на основании стационарных зависимостей изменения интенсивности флуоресценции от концентрации GdnHCl. Закрытые и открытые символы соответствуют процессам денатурации и ренатурации, соответственно. Параметр – концентрация GdnHCl. Показаны флуоресцентные характеристики, соответствующие нативному (N), промежуточным (I_1 и I_2) и полностью развернутому (U) состояниям. Числа – концентрации GdnHCl. Вставка: Зависимость параметра $A = (I_{320}/I_{365})_{297}$ (1) и анизотропии флуоресценции (2) от концентрации GdnHCl.

Рис. 3.2.7. Зависимость содержания α -спиралей (кривая 1), β -структур (кривая 2) и бесструктурных областей (кривая 3), определенного на основании анализа спектров CD, измеренных при разных концентрациях GdnHCl.

денатуранта. К моменту начала проведения этой работы в литературе не было единого мнения относительно числа и свойств промежуточных состояний, возникающих при разворачивании креатинкиназы под действием GdnHCl. В то же время было известно, что процесс разворачивания креатинкиназы осложнен ассоциацией частично-свернутых интермедиатов. В связи с этим одна из задач работы состояла в том, чтобы выявить и охарактеризовать возникающие в процессе разворачивания–сворачивания

промежуточные состояния и агрегированные формы белка (см. Kuznetsova et al., 2002a).

Даже беглый взгляд на изменение спектра флуоресценции креатинкиназы под действием GdnHCl (рис.3.2.2) позволяет судить о сложности происходящих в белке структурных превращений. На основании анализа изменений величины CD в ближней и дальней УФ-областях спектра (рис. 3.2.3 и 3.2.4) и изменения гидродинамического объема (рис.3.2.5), происходящих под действием GdnHCl, можно сделать заключение о том, что процесс разворачивания–сворачивания креатинкиназы происходит с образованием по крайней мере двух частично-свернутых промежуточных состояний. Первый интермедиат возникает в области 0.5-0.6 М GdnHCl. Белок в этом состоянии элюирует с колонки одним пиком, отвечающим радиусу Стокса $R_s=33.7\text{\AA}$, в то время как нативная креатинкиназа также элюирует с колонки одним пиком, соответствующим $R_s=35.3\text{\AA}$, что хорошо согласуется с литературными данными (см. Kuznetsova et al., 2002a) и подтверждает данные о том, что в нативном состоянии креатинкиназа является димером. Изменение радиуса Стокса при денатурации GdnHCl объяснено диссоциацией белка на мономеры, имеющие больший объем, чем в составе димера нативного белка. Белок в этом состоянии является компактным интермедиатом, имеющим вторичную структуру, сходную со вторичной структурой нативного белка, но несколько нарушенную третичную структуру, т.е. напоминает интермедиат типа расплавленной глобулы. Интересно, однако, отметить, что креатинкиназа уже в нативном состоянии связывает АНС и интенсивность флуоресценции красителя лишь незначительно возрастает при увеличении концентрации GdnHCl, причем максимальная интенсивность АНС наблюдается в растворах 0.3 М GdnHCl. Второй интермедиат наблюдается в области 2.0-2.5 М GdnHCl и характеризуется нарушением вторичной структуры и увеличением R_s , т.е. имеет свойства, характерные для состояния типа "предшественник расплавленной глобулы".

С помощью метода собственной УФ-флуоресценции удалось также зафиксировать изменения структуры белка при небольших концентрациях денатуранта (0.1 М GdnHCl). Зависимости величины параметра A и анизотропии флуоресценции (рис. 3.2.6, вставка) свидетельствуют о существовании двух интермедиатов I_1 и I_2 при 0.1 и 0.6 М GdnHCl, соответственно. Обращает на себя внимание тот факт, что с помощью метода собственной УФ-флуоресценции впервые удалось показать возникновение промежуточного состояния под действием малых концентраций GdnHCl, ранее зафиксированного по изменению каталитической активности фермента [29], но не удалось зарегистрировать промежуточное состояние в области 2.0-2.5 М GdnHCl, существование которого было показано с помощью методов CD и гельпроникающей хроматографии. Однако все три промежуточных состояния креатинкиназы удалось за-

фиксировать с использованием метода, основанного на построении параметрических зависимостей (рис.3.2.6).

Интересно отметить, что промежуточное состояние, возникающее при 2.0-2.5 М GdnHCl, обогащено β -структурами (рис.3.2.7), наличие которых является явной предпосылкой к образованию агрегатов. Дальнейшее подтверждение существования агрегатов было получено методом гельпроникающей хроматографии (см. Kuznetsova et al., 2002a). Надо подчеркнуть, что агрегация, наблюдаемая при разворачивании креатинкиназы, необычна. Хорошо известно, что агрегация частично-свернутых белков является основной причиной того, что процессы денатурации необратимы. Однако в случае креатинкиназы показана высокая обратимость процессов разворачивания. Более того, было установлено, что растворимые агрегаты, накапливающиеся при разворачивании креатинкиназы, полностью ренатурируют после удаления денатурирующих агентов.

3.3. Множественность денатурированных частично-свернутых состояний однодоменного белка – карбоангидразы II. Карбоангидраза – небольшой однодоменный цинк-содержащий белок с выраженной β -складчатой структурой (рис. 3.3.1), единственная полипептидная цепь которого состоит из 259 аминокислотных остатков. Карбоангидраза является ферментом, относящимся к классу карбонат-дегидрогеназ. Относительно небольшие размеры карбоангидразы (29 кDa), отсутствие дисульфидных связей и свободных SH-групп сделали карбоангидразу предметом интенсивного изучения процессов разворачивания–сворачивания ([31], см также ссылки в Bushmagina et al., 2001). Изучение разворачивания–сворачивания этого фермента было предпринято, в связи с надеждой выявить (используя параметрическое представление экспериментальных данных по разворачиванию–сворачиванию) новые, ранее неустановленные промежуточные состояния и, в частности, состояние, обусловленное стабилизирующим действием на структуру белка малых концентраций GdnHCl, подобно промежуточному состоянию, обнаруженному для креатинкиназы при 0.1 М GdnHCl.

С помощью метода собственной УФ-флуоресценции установлено существование трех конформационных превращений карбоангидразы под действием GdnHCl: $N \rightleftharpoons I_1$ при изменении концентрации GdnHCl от 0 до 0.1 М, $I_1 \rightleftharpoons I_2$ при изменении концентрации GdnHCl от 0.1 до 1.0 М, и $I_2 \rightleftharpoons U$ в области концентрации GdnHCl от 1.0 до 2.2 М (рис. 3.3.2 и 3.3.3).

Регистрация интенсивности флуоресценции АНС, однако, показала, что разворачивание карбоангидразы под воздействием GdnHCl в области концентраций 1.0–2.2 М проходит через образование промежуточного состояния, максимальное содержание которого наблюдается при 1.5 М GdnHCl. В этом состоянии белок имеет более высокое значение анизотропии флуоресценции по сравнению с нативным ферментом,

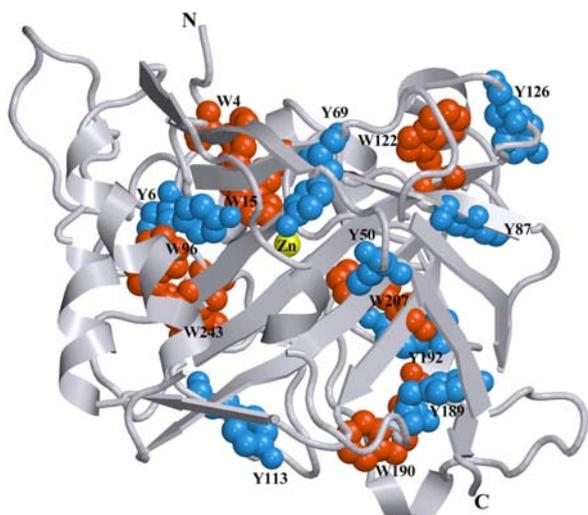


Рис. 3.3.1. Пространственная структура карбоангидразы II.

Показана локализация триптофановых и тирозиновых остатков, а также иона цинка. Использованы данные Банка белковых структур [20], файл 1V9E.ent [30]. Для построения изображений использовали графические программы VMD [23] и Raster3D [24].

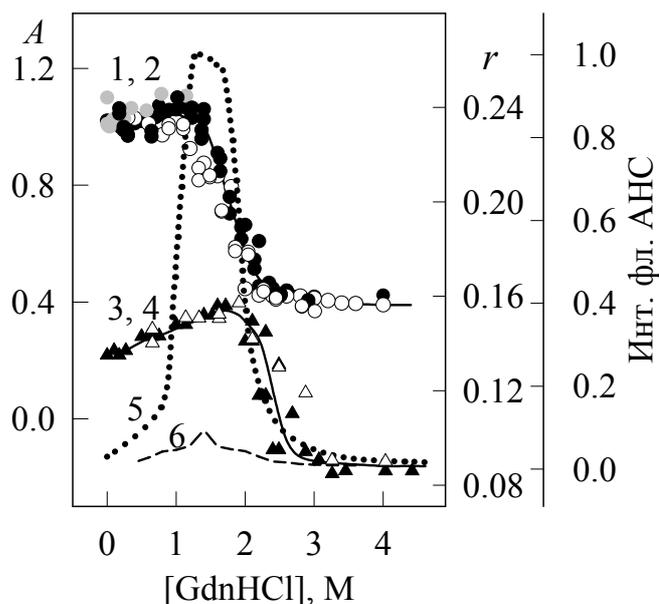


Рис. 3.3.2. Денатурация карбоангидразы II гуанидингидрохлоридом.

Показаны изменения параметра $A = I_{320}/I_{365}$ (кривые 1, 2), анизотропии флуоресценции (кривые 3, 4) и интенсивности флуоресценции АНС (кривые 5, 6). Кривые 1, 3, 5 – денатурация (закрытые символы), кривые 2, 4, 6 – ренатурация (открытые символы).

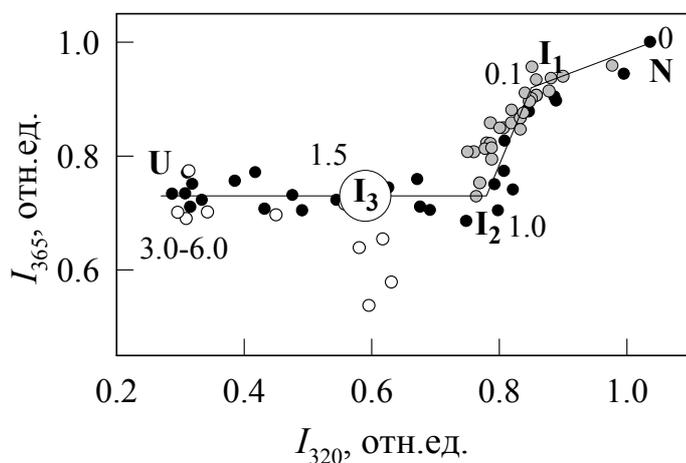


Рис.3.3.3. Параметрическая зависимость между интенсивностями флуоресценции I_{320} и I_{365} , характеризующая разворачивание–сворачивание карбоангидразы II под действием GdnHCl.

Параметр – концентрация GdnHCl. N – нативное состояние, I_1 , I_2 и I_3 – промежуточные состояния, возникающие при 0.1, 1.0 и 1.5 М GdnHCl, U – развернутое состояние при 3.0–6.0 М GdnHCl. Закрытые символы – денатурация, открытые и серые – ренатурация из 6.0 М и 1.2 М GdnHCl, соответственно.

а также существенно (в 100 раз) более высокую интенсивность флуоресценции АНС (рис.3.3.2). Это промежуточное состояние (I_3) никак не проявляется на кривых зависимости интенсивностей флуоресценции I_{320} , I_{365} и параметра A от концентрации GdnHCl, а также при параметрическом представлении изменения интенсивности флуоресценции при длинах волн 320, 365 нм. Последнее, по-видимому, обусловлено тем, что величины характеристик I_{320} , I_{365} и A для состояния I_3 имеют промежуточные значения по сравнению с соответствующими значениями для состояний I_2 и U (Kuznetsova et al., 2002 b; Turoverov et al., 2002 b; Kuznetsova et al., 2004).

3.4. Одностадийный обратимый характер разворачивания–сворачивания дисульфидизомеразы С. Дисульфидизомераза С из *Escherichia coli* – это растворимый белок бактериальной периплазмы, который отвечает за образование "правильных" дисульфидных связей во вновь синтезированных белках. В связи с этим дисульфидизомераза С считается бактериальным аналогом изомеразы дисульфидных связей (PDI) эндоплазматического ретикулума эукариот. Подобно PDI, дисульфидизомераза С обладает шаперонной активностью даже более выраженной, чем у PDI (см. ссылки в работах Кузнецова и др., 2005б; Stepanenko et al., 2004 a). Макромолекула дисульфидизомеразы С имеет V-образную форму, в которой каждая ветвь представляет собой одну субъединицу гомодимера. Каждая субъединица состоит из N-концевого домена, ответственного за ассоциацию субъединиц, и С-концевого тиоредоксинподобного (Trx) домена, которые связаны между собой подвижной спиралью [32] – рис. 3.4.1.

Нами было установлено, что стационарные зависимости всех флуоресцентных характеристик дисульфидизомеразы С (I_{320} , I_{365} , A) от содержания в растворе GdnHCl имеют S-образный характер, причем все изменения происходят в узком интервале концентраций денатуранта (рис. 3.4.2) (Stepanenko et al., 2004; Кузнецова и др. 2005 б). Наличие изобестической точки при 340 нм для спектров флуоресценции (рис. 3.4.3), свидетельствует о том, что разворачивание дисульфидизомеразы С под действием GdnHCl является одностадийным.

Для подтверждения этого предположения на основании измерения стационарных зависимостей интенсивности флуоресценции I_{320} и I_{365} от концентрации GdnHCl была построена параметрическая зависимость между интенсивностями флуоресценции I_{320} и I_{365} (параметр – концентрация GdnHCl). Аналогичная параметрическая зависимость была построена на основании кинетических измерений интенсивностей флуоресценции I_{320} и I_{365} при переводе белка в раствор GdnHCl с концентрацией 2.4 М (параметр – время). Оказалось, что обе параметрические зависимости хорошо аппроксимируются прямыми и совпадают друг с другом (рис. 3.4.4).

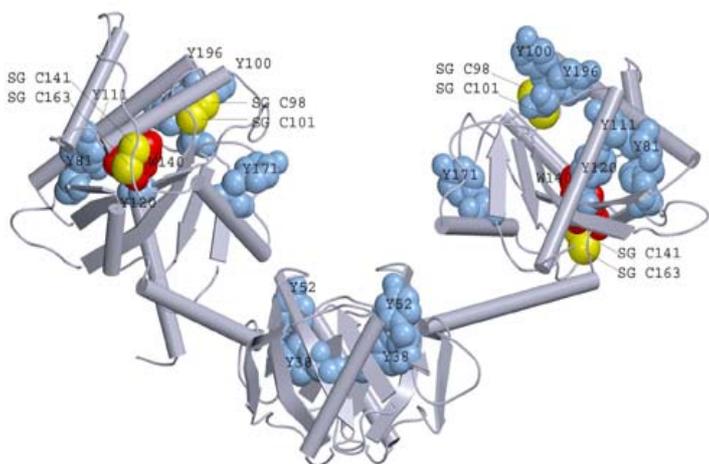


Рис. 3.4.1. Пространственная структура DsbC.

Показаны атомы серы дисульфидных связей. При подготовке рисунка использованы графические программы VMD [23] и Raster3D [24]. Используются данные Банка белковых структур [20], файл 1EEJ.ent [38].

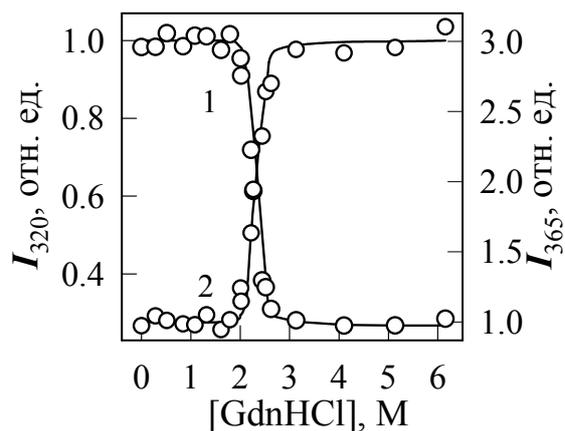


Рис. 3.4.2. Денатурация DsbC под действием GdnHCl.

Интенсивность флуоресценции, измеренная при 320 нм (кривая 1) и при 365 нм (кривая 2).

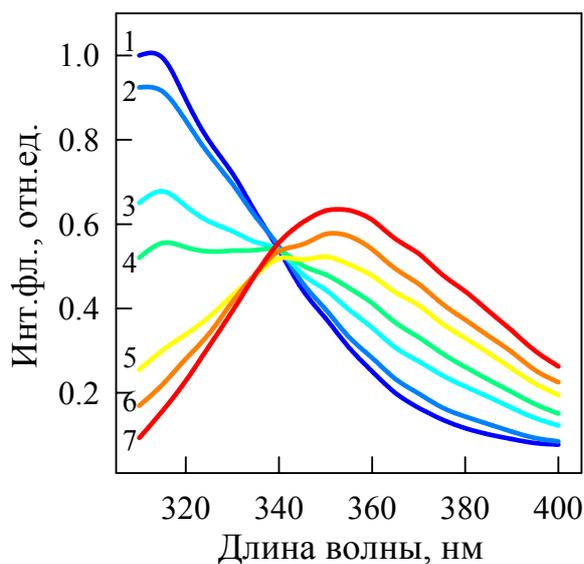


Рис. 3.4.3. Изменение спектра флуоресценции DsbC при денатурации GdnHCl.

1- усредненный спектр флуоресценции при 0.0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50 и 1.75 M GdnHCl; 2, 3, 4, 5 и 6, спектры флуоресценции при 2.0, 2.2, 2.4, 2.6 и 2.8 M GdnHCl, соответственно; 7 - усредненный спектр флуоресценции при 3.0, 4.0, 5.0 и 6.0 M GdnHCl. $\lambda_{\text{ex}} = 297$ нм.

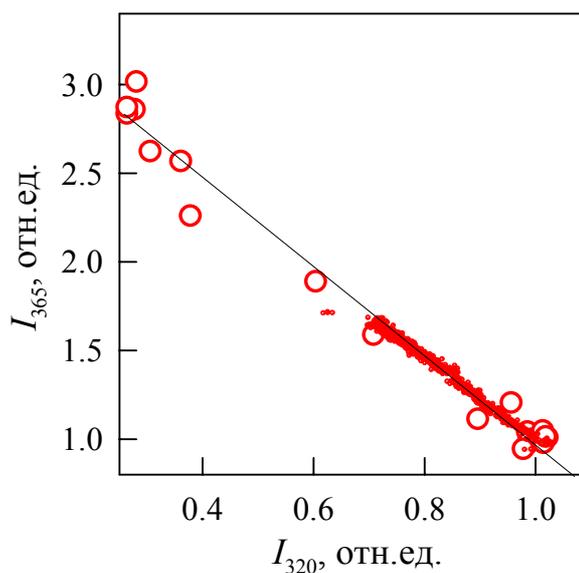


Рис. 3.4.4. Параметрическая зависимость между I_{320} и I_{365} нм DsbC.

Открытые символы – данные стационарных зависимостей интенсивности флуоресценции от концентрации GdnHCl. Точки – данные кинетических зависимостей интенсивности флуоресценции под действием 2.4 M GdnHCl (параметр – время). $\lambda_{\text{ex}} = 297$ нм.

Эксперименты по ренатурации дисульфидизомеразы С свидетельствуют об обратимом характере процесса денатурации. Таким образом, денатурация этого двухдоменного димерного белка под действием GdnHCl является обратимой и осуществляется по принципу "все или ничего".

3.5. Кинетические интермедиаты на пути разворачивания–сворачивания белков. Новое представление о процессах разворачивания–сворачивания 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 актина входит одна молекула АТФ и прочно связанный двухвалентный катион Ca^{2+} ([33], рис. 3.5.1).

До недавнего времени считалось, что процесс разворачивания–сворачивания актина проходит через стадию образования промежуточного состояния, получившего название инактивированного актина [34-37]. 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 (см. [37-42]).

Характер равновесных (а точнее квазиравновесных) зависимостей ряда флуоресцентных характеристик актина от концентрации GdnHCl, казалось бы однозначно свидетельствует о существовании двух последовательных конформационных переходов и о существовании области концентраций GdnHCl, в которой актин находится преимущественно в инактивированном состоянии (рис. 3.5.2.). На основании подобного рода данных во всех без исключения работах, посвященных денатурации актина, считалось, что инактивированный актин (I) является промежуточным состоянием между нативным (N) и полностью развернутым (U) состоянием белка: $\text{N} \longrightarrow \text{I} \rightleftharpoons \text{U}$. В эту схему, однако, совершенно не укладывались данные о том, что инактивированный актин является термодинамически стабильным монодисперсным ассоциатом, состоящим из 15 мономерных единиц [40, 41]. 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.

Характер кинетических зависимостей интенсивности флуоресценции (рис.3.5.2), параметра A и анизотропии триптофановой флуоресценции (кривые с минимумом при концентрациях GdnHCl 1.2 – 1.5 М; свидетельствует о том, что переход из нативного

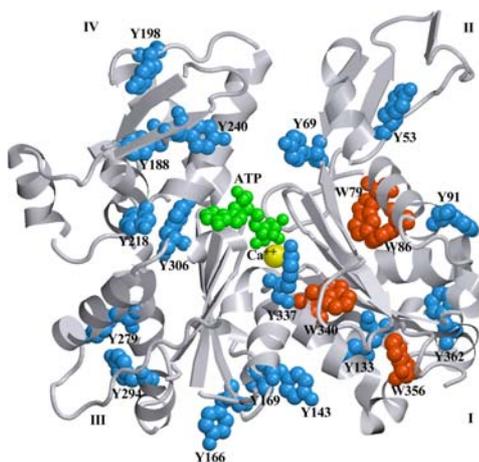


Рис. 3.5.1. Пространственная структура молекулы актина.

Показаны триптофановые остатки, тирозиновые остатки катиона Ca^{2+} и молекула АТФ. Римские цифры – субдомены актина. Использованы данные Protein Data Bank [20], файл 1ATN.ent [33]. При подготовке рисунка использовали графические программы VMD [23] и Raster 3D [24].

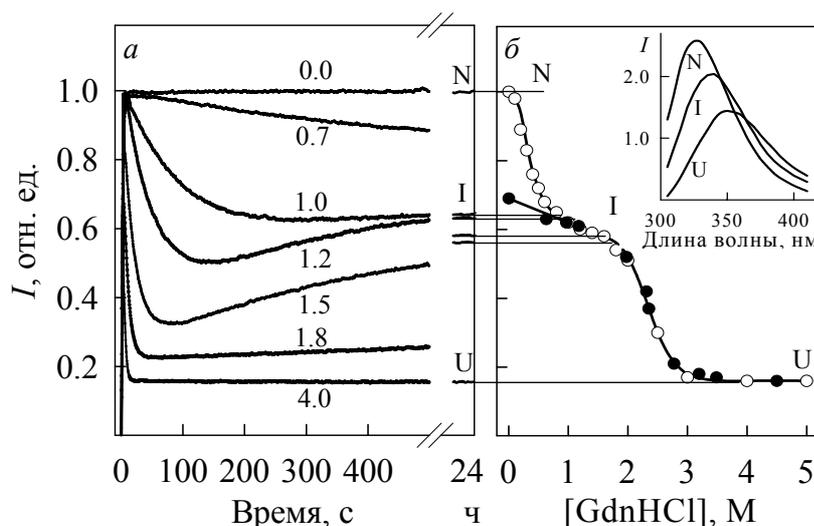


Рис. 3.5.2. Изменение интенсивности собственной флуоресценции актина при его денатурации ($\lambda_{\text{возб}} = 297$ нм; $\lambda_{\text{рег}} = 320$ нм).

a – Кинетика денатурации актина под действием GdnHCl. Числа – концентрации GdnHCl, М; *b* – зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации GdnHCl, зарегистрированная после 24 ч инкубации белка в GdnHCl.; *открытые* и *закрытые* символы соответствуют экспериментам по денатурации и ренатурации, соответственно. Вставка: Спектры флуоресценции нативного (N), инактивированного (I), и полностью развернутого (U) актина. $\lambda_{\text{возб}} = 297$ нм.

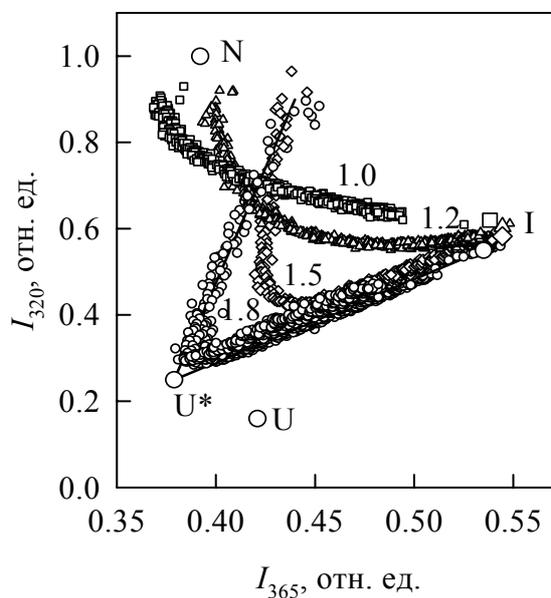


Рис. 3.5.3. Параметрические зависимости между интенсивностями флуоресценции I_{320} и I_{365} , характеризующие кинетику разворачивания нативного актина под действием GdnHCl.

Параметр – время, прошедшее после добавления к нативному актину растворов GdnHCl различной концентрации; числа – концентрация GdnHCl, М. Большая часть экспериментальных точек соответствует первым 10 мин после перевода белка в растворы GdnHCl соответствующей концентрации. Конечные точки (*символы большего размера*) – зарегистрированы после 24 ч инкубации. За единицу принята интенсивность флуоресценции нативного актина, $\lambda_{\text{рег}} = 320$ нм.

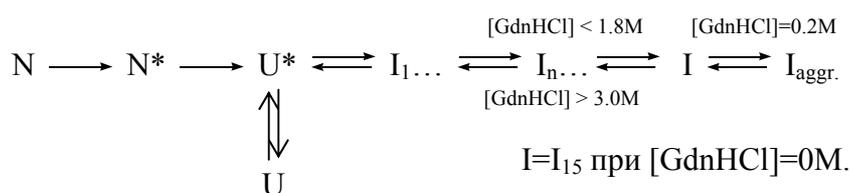
состояния в инактивированное осуществляется через некоторое промежуточное состояние, в котором интенсивность флуоресценции, параметр A и величина анизотропии флуоресценции меньше, чем в нативном и в инактивированном состояниях: $N \longrightarrow U^* \rightleftharpoons I$, где U^* – существенно развернутый кинетический интермедиат, флуоресцентные свойства которого сходны со свойствами полностью развернутого актина (Turoverov et al., 2002 *a*; Поварова и др., 2005).

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. 3.5.3). Характер параметрической зависимости при денатурации актина под действием 1.8 М GdnHCl однозначно свидетельствует о существовании кинетического интермедиата между нативным и инактивированным актином. Точка на диаграмме, в которой пересекаются прямые, отвечающие процессу разворачивания нативного актина ($N \longrightarrow U^*$) и процессу образования инактивированного актина из существенно развернутого состояния ($U^* \longrightarrow I$), 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 6М GdnHCl.

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. 3.5.3). Эксперименты по изучению быстрой кинетики структурных превращений актина под действием GdnHCl различной концентрации с использованием оборудования стоп-флюу позволили показать существование интермедиата N^* , предшествующего образованию существенно развернутого кинетического интермедиата U^* . Результаты работы Альтшулера и др. [18] позволили предположить, что кинетический интермедиат N^* – это интермедиат типа расплавленной глобулы, возникающий при диссоциации иона кальция. Тогда U^* – это, скорее всего, интермедиат типа "предшественник расплавленной глобулы" (Kuznetsova et al., 2002 *b*).

На основании всех экспериментальных данных была предложена следующая схема разворачивания актина под воздействием GdnHCl (см. Поварова и др., 2005,

Kuznetsova et al., 2002b; Turoverov et al., 2003):



Согласно этой схеме, вновь обнаруженные кинетические интермедиаты N^* и U^* являются промежуточными состояниями на пути разворачивания–сворачивания актина, в то время как инактивированный актин, ранее считавшийся промежуточным состоянием, на самом деле является монодисперсным ассоциатом, образование которого препятствует правильному сворачиванию белка *in vitro*. Получены новые данные о свойствах инактивированного актина. Показано, что присутствие в растворе небольших концентраций GdnHCl приводит к агрегации инактивированного актина (агрегации ассоциатов) – см. раздел 4.4. Этот эффект, объясненный в работе изменением заряда инактивированного актина за счет взаимодействия катионов GdnHCl (GuH^+) с группами C=O, необходимо учитывать в работах по изучению фолдинга белков при использовании GdnHCl в качестве денатуранта.

3.6. Роль четвертичной структуры в стабилизации флуоресцентных белков. Термин "флуоресцентные белки" или "GFP-подобные белки" используется для обозначения обширного класса белков, характерной особенностью которых является наличие у них уникального хромофора, образующегося в результате трехстадийной аутокаталитической циклизации трех аминокислотных остатков в положении 65-67. Все белки этого класса представляют собой цилиндр, образованный 11 β -листами (β -cap), в центре которого проходит α -спираль, содержащая хромофор. Большой интерес к флуоресцентным белкам вызван их интенсивным использованием в клеточной биологии в качестве биологических маркеров для изучения динамики генной экспрессии и транспорта белков в живых клетках и тканях ([43]; см. также Степаненко, 2005б; Verkhusa et al., 2003; Stepanenko et al., 2004 b).

Измерены кинетические и квазиравновесные зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации денатуранта. Показано, что тетрамер зеленого белка (zFP506) обладает большей стабильностью по сравнению с мономером (EGFP). Показано также, что димер красного белка (dimer2) обладает меньшей стабильностью по сравнению с тетрамером (DsRed1). Однако стабильность мономера красного белка (mRFP1) оказалась приблизительно такой же, как стабильность тетрамера (DsRed1). На основании совокупности полученных результатов сделан вывод о том, что, хотя четвертичная структура имеет существенное значение в стабилизации флуоресцентных белков, она не является единственным фактором, определяющим существенные

различия их конформационной стабильности (Степаненко, 2005 б; Stepanenko et al., 2004 b). Это говорит о том, что стабильность белка может быть значительно увеличена в результате введения соответствующим образом подобранных аминокислотных замен, при этом нет необходимости сохранять присущую многим флуоресцентным белкам тетрамерную организацию. Этот результат может представлять интерес при создании новых флуоресцентных биомаркеров.

3.7. Влияние денатурирующего воздействия на процесс разворачивания–сворачивания белка. Результаты, полученные для ряда двухдоменных белков (актина, креатинкиназы, дисульфидизомеразы С, глутамин-связывающего белка) и однодоменного белка карбоангидразы II, свидетельствуют о том, что способность белков к обратимому одностадийному разворачиванию нельзя однозначно связывать с их размером и мультиплетностью. В тоже время, если 1) обратиться к истории развития представлений о процессах разворачивания–сворачивания актина; 2) проанализировать результаты изучения разворачивания карбоангидразы II с учетом впервые выдвинутого в настоящей работе представления о возможности GdnHCl оказывать агрегирующее действие на белки (раздел 4.4); 3) учесть влияние лигандов на характер процесса денатурации глутамин-связывающего белка; 4) принять во внимание, что значительная по величине интенсивность флуоресценции АНС наблюдается для креатинкиназы в отсутствие GdnHCl, когда белок является димером, то можно сделать некоторые обобщающие заключения.

Представления о том, как разворачивается актин сильно изменялось по мере того, как для изучения разворачивания–сворачивания этого белка использовались более адекватные методы исследования. Действительно, измерение стационарных зависимостей интенсивности флуоресценции, параметра A , интенсивности флуоресценции АНС, CD в дальней и ближней УФ-областях спектра [40] от концентрации GdnHCl создает полную иллюзию того, что инактивированный актин, образующийся в области концентраций GdnHCl от 0.8 до приблизительно 1.8 М, является промежуточным состоянием со свойствами близкими к свойствам состояния типа расплавленной глобулы (Turkoverov et al., 2002). Однако, необратимость процесса денатурации актина, существенное возрастание анизотропии флуоресценции в этой области концентраций GdnHCl, наличие выраженного спектра CD в ближней УФ-области заставило усомниться в справедливости такого представления [37]. Сочетание метода седиментации и гельпроникающей хроматографии позволило сделать заключение о том, что инактивированный актин является монодисперсным ассоциатом, состоящим из 15 (15 ± 1) мономерных единиц [42].

Измерение кинетических зависимостей интенсивности флуоресценции, параметра A и анизотропии флуоресценции позволило заключить, что инактивированный

актин образуется из нативного через стадию образования существенно развернутого кинетического интермедиата U^* (Turoverov et al., 2002). Существенным при проведении этих экспериментов было то, что измерялись кинетические кривые при переводе нативного белка в растворы GdnHCl различной концентрации. Изучение кинетики превращения $N \longrightarrow U$ при переводе нативного актина в растворы с концентрацией GdnHCl больше 3 М не позволило бы обнаружить интермедиат U^* .

Использование параметрического подхода для представления результатов кинетических экспериментов позволило заключить, что состояние U^* отличается от полностью развернутого состояния U (Kuznetsova et al., 2002). Более того, характер параметрических зависимостей, измеренных при переводе белка в растворы GdnHCl различной концентрации, позволил предсказать существование еще одного кинетического интермедиата N^* , существование которого затем было подтверждено нами с использованием оборудования типа stopped flow (Поварова и др., 2005), а также в работе Альтшулера и др. [18]. Авторы этой работы считают, что путем использования в экспериментах очень низкой концентрации белка (0.01 мг/мл) им удалось избежать агрегации (ассоциации) продукта, возникающего при отщеплении иона Са под действием ЭДТА. Однако величина параметра A для этого продукта, определенная нами на основании спектра флуоресценции, приведенного в их работе, оказалась равной приблизительно 1.3, что соответствует величине, характерной для инактивированного актина (ассоциата). Обратимость процесса денатурации актина, о которой сообщают авторы этой работы, обусловлена, по-видимому, не тем, что удалось получить мономерный продукт, а присутствием в их системе шаперонина ССТ.

Результаты изучения кинетики разворачивания актина при переводе белка в растворы с различным содержанием GdnHCl позволяют нам заключить, что процесс разворачивания актина при его переводе в раствор GdnHCl с концентрацией более 3М также проходит через стадии образования состояний N^* и U^* , хотя и создается впечатление, что этот переход ($N \longrightarrow U$) является одностадийным, поскольку скорости процессов $N \longrightarrow N^*$, $N^* \longrightarrow U^*$ и $U^* \longrightarrow U$ велики. Отщепление иона Са под действием GdnHCl при малых концентрациях денатуранта – медленный процесс (Kuznetsova et al., 2002). Под действием ЭДТА этот процесс будет осуществляться очень быстро. В то же время, в отсутствие GdnHCl процесс $U^* \longrightarrow I$ также должен происходить с большой скоростью. Таким образом, хотя разворачивание актина под действием ЭДТА представляется как одностадийный переход $N \longrightarrow I$, на самом деле имеет место мультистадийный процесс $N \longrightarrow N^* \longrightarrow U^* \longrightarrow I$. Использование аппаратуры stopped flow позволило наблюдать процесс $N \longrightarrow N^*$ [18].

Процесс разворачивания карбоангидразы выглядит как одностадийный или как проходящий через образование промежуточного состояния типа расплавленной гло-

булы в зависимости от того, насколько адекватными были методы, используемые для изучения процессов разворачивания–сворачивания и даже от того, какой денатурант был при этом использован: GdnHCl или мочевины (см. раздел 3.3, Bushmarina et al., 2001). На самом деле процесс разворачивания карбоангидразы под действием GdnHCl, мочевины, а также под действием изменения pH проходит через стадию образования промежуточного состояния типа расплавленной глобулы (Bushmarina et al., 2001).

Интересную пищу для размышлений дает сравнительный анализ денатурации глутамин-связывающего белка и его комплекса и глутамином. Связывание лиганда стабилизирует структуру белка. Процессы разворачивания структуры белка, по-видимому, начинаются после диссоциации комплекса. Это создает иллюзию того, что разворачивание комплекса осуществляется по принципу "все или ничего", хотя на самом деле процесс денатурации комплекса осуществляется по тому же сценарию, что и процесс денатурации глутамин-связывающего белка. Этот пример показывает, что одностадийный характер разворачивания макромолекулы белка может быть результатом того, что в структуре имеется какой-то элемент, удерживающий всю структуру от разворачивания. В случае комплекса глутамин-связывающего белка с глутамином, структура "выдерживает" денатурирующее действие GdnHCl до тех пор, пока не происходит диссоциации комплекса. Похожая ситуация известна в литературе, например, актин защищает тропомиозин, находящийся на его поверхности, от тепловой денатурации, которая начинается только после диссоциации актина в узком температурном интервале [26].

В случае глобулярного актина таким стабилизирующим элементом является ион кальция, присутствие которого, крайне существенно для поддержания структуры и функционирования многих белков [27]. Отщепление иона Ca, по-видимому, является тем "спусковым крючком", который запускает цепь конформационных превращений актина, приводящих к образованию существенно развернутого интермедиата, а затем к образованию инактивированного актина (см. раздел 3.5). Интересно отметить, что разворачивание дисульфидизомеразы C происходит при достаточно высокой концентрации GdnHCl (начинается при 1.75 M GdnHCl, в отличие от актина и глутамин-связывающего белка, для которых процесс денатурации начинается при минимальных концентрациях денатуранта) и происходит в узком интервале концентраций денатуранта. Можно полагать, что чем большую концентрацию денатуранта выдерживает белок до денатурации, тем более кооперативно он будет разворачиваться.

Представленные выше данные позволили нам сформулировать концепцию о том, что путь разворачивания, последовательность образования и число возникающих

денатурированных частично-свернутых состояний каждого конкретного белка не зависит от характера денатурирующего воздействия и стабилизации структуры при связывании лиганда.

Инактивированный актин оказался исключительно интересной моделью, позволившей открыть принципиально новое свойство GdnHCl – его способность вызывать при определенных условиях агрегацию белков (см. раздел 4.4). В случае инактивированного актина обнаружить факт его агрегации под действием GdnHCl оказалось очень просто ввиду того, что агрегация инактивированного актина (агрегация ассоциатов) приводит к возникновению крупных образований и, как следствие, к существенному возрастанию интенсивности светорассеяния. Способность GdnHCl вызывать ассоциацию (агрегацию) актина позволяет по-новому взглянуть на процессы разворачивания–сворачивания других белков.

Наше внимание уже давно привлекал процесс образования под действием GdnHCl состояния типа расплавленной глобулы для карбоангидразы II [31]. По способности связывать АНС промежуточное состояние I_3 карбоангидразы (см. раздел 3.3) можно считать состоянием типа расплавленной глобулы. Однако очень странно, что образование этого интермедиата сопровождается возрастанием анизотропии триптофановой флуоресценции, если иметь в виду, что одним из основных признаков состояния типа расплавленной глобулы является увеличение подвижности боковых цепей аминокислотных остатков. Учитывая данные, полученные для инактивированного актина (см. раздел 4.4), этот эффект можно объяснить ассоциацией молекул карбоангидразы после их перехода в состояние типа расплавленной глобулы. При этом становится понятным, почему растет величина анизотропии триптофановой флуоресценции вплоть до той концентрации GdnHCl, которая отвечает максимальному содержанию молекул в состоянии расплавленной глобулы.

Подтверждением справедливости этого предположения является то, что разворачивание карбоангидразы под действием мочевины также проходит через образование состояния типа расплавленной глобулы [31], хотя в этом случае и не наблюдается увеличения интенсивности флуоресценции АНС. Во всей области концентраций мочевины от 0 до 8 М для растворов карбоангидразы сохраняется низкий уровень интенсивности флуоресценции АНС (Bushmarina et al., 2001).

Интересно отметить, что в случае креатинкиназы значительная по величине интенсивность флуоресценции АНС наблюдается для белка в отсутствие GdnHCl, когда белок является димером (Kuznetsova et al., 2002 a). Возрастание интенсивности флуоресценции АНС при разворачивании глутамин-связывающего белка под действием GdnHCl (переход $N \rightarrow I_1$, раздел 3.1), по-видимому, также связано с образованием ассоциатов макромолекул белка после их перехода в состояние типа расплав-

ленной глобулы. Об этом свидетельствует тот факт, что анизотропия флуоресценции в этой области концентраций GdnHCl остается неизменной, несмотря на достаточно значительное изменение эллиптичности и величины параметра A (Staiano et al., 2005; Степаненко и др., 2005 а).

Представленные выше экспериментальные данные позволяют нам выдвинуть гипотезу о том, что АНС, на самом деле, связывается не с гидрофобными кластерами на поверхности белка в состоянии расплавленной глобулы, а с ассоциатами макромолекул белка в состоянии расплавленной глобулы, образующимися в результате "слипания" макромолекул за счет гидрофобных взаимодействий в отсутствие электростатического отталкивания.

Глава 4. Новые методические разработки

Большинство исследований выполнено с использованием стандартных физико-химических методов: кругового дихроизма в дальней и ближней УФ-области спектра, собственной УФ-флуоресценции (интенсивность и спектр флуоресценции, параметр $A = I_{320}/I_{365}$, характеризующий положение спектра флуоресценции, анизотропия флуоресценции, кривые затухания флуоресценции и времена жизни возбужденного состояния, константы тушения внешним тушителем акриламидом), флуоресценции АНС и тиофлавина Т, гельпроникающей хроматографии. Измерения собственной флуоресценции всегда сочетались с анализом информации о свойствах микроокружения и особенностях локализации триптофановых (тирозиновых) остатков исследуемых белков (Туроверов и др., 2001; Kuznetsova et al., 2000). При этом была использована информация о пространственной структуре белков, содержащаяся в Банке белковых структур [20].

Измерение стационарных (равновесных или квазиравновесных) зависимостей различных физико-химических характеристик от концентрации денатуранта сочеталось с изучением кинетики разворачивания и(или) сворачивания белка. Изучение кинетики разворачивания актина под действием GdnHCl позволило, в частности, коренным образом пересмотреть представления о роли инактивированного актина в процессах разворачивания–сворачивания этого белка, а также выявить возникающие в процессе разворачивания белка ранее неизвестные кинетические интермедиаты (раздел 3.5). Широко использован при исследовании фолдинга белков и получил существенное развитие метод, основанный на параметрическом представлении экспериментальных данных (раздел 4.1). Результаты исследования процессов разворачивания–сворачивания белков под действием GdnHCl позволили выявить ряд особенностей во взаимодействии этого денатуранта с белками, которые необходимо учитывать в дальнейшей работе (раздел 4.4). Для развития метода собственной УФ-флуоресцен-

ции белков существенное значение могут иметь результаты, свидетельствующие о зависимости триптофановой флуоресценции глутамин-связывающего белка от длины волны возбуждающего света (раздел 4.3). В работе продемонстрированы перспективы использования метода триптофановой ФКТ для изучения процессов разворачивания–сворачивания и свойств возникающих при этом аморфных и фибриллярных агрегированных форм белков (раздел 4.2).

4.1. Параметрический метод представления экспериментальных данных по разворачиванию–сворачиванию белков. Впервые подход, основанный на построении параметрических зависимостей интенсивностей флуоресценции, зарегистрированных при двух длинах волн для изучения конформационных превращений белков, был предложен Бурштейном [16, 17] и назван им методом фазовых диаграмм. В последующие годы этот метод использовался крайне редко (см., например, [44]).

Этот метод основан на том, что если переход между состояниями 1 и 2 происходит по принципу "все или ничего", т. е. без образования промежуточных состояний, то регистрируемая экспериментально параметрическая зависимость между любыми двумя экстенсивными характеристиками (X и Y) должна быть линейной: $Y(\theta) = a + bX(\theta)$, где θ – любой параметр, в зависимости от величины которого изменяется относительная доля компонент $\alpha_1(\theta)$ и $\alpha_2(\theta)$ в системе, $\alpha_1(\theta) + \alpha_2(\theta) = 1$. Если параметрическая зависимость двух экстенсивных характеристик системы не является линейной, то это однозначно свидетельствует о том, что регистрируемый процесс превращения исследуемого объекта из начального в конечное состояние не является одностадийным и происходит с образованием одного или нескольких промежуточных состояний (Turoverov et al., 2002b; Kuznetsova et al., 2004).

Этот подход был использован нами для доказательства существования нескольких промежуточных состояний, которые возникают в процессе денатурации карбоангидразы (Bushmarina et al., 2001), креатинкиназы (Kuznetsova et al., 2002 a) и дисульфидизомеразы С (Stepanenko et al., 2004a; Кузнецова и др., 2005б; Степаненко и др., 2005a) под воздействием GdnHCl. В работе по изучению процессов разворачивания–сворачивания актина этот метод впервые был использован для анализа данных, полученных в ходе выполнения кинетических экспериментов (Kuznetsova et al., 2002b; Turoverov and Kuznetsova, 2003; Поварова и др., 2005). В настоящее время метод широко используется уже не только в нашей, но и в других лабораториях (см., например, [18, 19]).

4.2. Триптофановая фосфоресценция при комнатной температуре. Перспективы использования метода для изучения фолдинга белков. Основным механизмом тушения фосфоресценции в среде, не содержащей кислорода, является дезактивация возбужденных триплетных состояний в результате непланарной деформации

структуры хромофора при соударении с молекулами окружающей среды. Поэтому фосфоресценцию обычно наблюдают в жестких матрицах при низкой температуре. В то же время установлено, что некоторые белки в растворе фосфоресцируют при комнатной температуре [45, 46]. Это обусловлено тем, что в этих условиях достигается необходимая для возникновения фосфоресценции жесткость микроокружения триптофановых (тирозиновых) остатков.

В работе показано, что интенсивность ФКТ и время жизни возбужденного триплетного состояния для инактивированного актина (ассоциата, состоящего из 15 мономерных единиц) больше, чем для нативного актина (Мажуль и др., 2001; 2003; 2005; Mazhul' et al., 2003), и что образование амилоидных фибрилл на основе α -лактальбумина и инсулина приводит к увеличению жесткости микроокружения триптофановых и тирозиновых остатков и появлению триптофановой (тирозиновой) ФКТ (Мажуль и др., 2005). Таким образом, было показано, что измерение интегральной интенсивности (относительного квантового выхода) и времени затухания ФКТ естественных хромофоров белка – триптофановых и тирозиновых остатков – может стать перспективным методическим подходом для изучения свойств аморфных агрегатов, фибриллогенеза и свойств амилоидных фибрилл.

4.3. Зависимость характеристик триптофановой флуоресценции белка от длины волны возбуждающего света в нативном и развернутом состояниях. Обычно принимается, что характеристики триптофановой флуоресценции каждого конкретного белка в нативном состоянии не зависят от длины волны возбуждающего света. Это предположение, в частности, лежит в основе существующего подхода оценки вклада тирозиновых остатков в суммарную флуоресценцию белка. Однако для глутамин-связывающего белка оказалось, что интенсивность триптофановой флуоресценции нативного белка при $\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм меньше интенсивности флуоресценции, измеренной при $\lambda_{\text{возб}} = 297$ нм. Эффект объяснен спектральной зависимостью относительного вклада Trp 32 и Trp 220 в поглощение этого белка ([47], Степаненко и др., 2005a; Kuznetsova et al., 2005). Такая ситуация может иметь место и для других белков. Предложена методика нормировки спектров нативного белка, позволяющая учитывать это обстоятельство. Методика основана на том, что в полностью развернутом белке все особенности микроокружения отдельных триптофановых и тирозиновых остатков нивелируются. Зависимость триптофановой флуоресценции белка от длины волны возбуждения должна приниматься в расчет при оценке вклада тирозиновых остатков в суммарную флуоресценцию белка.

4.4. Особенности использования GdnHCl в качестве денатуранта. Общепринятым приемом исследования фолдинга белков *in vitro* является регистрация процессов их разворачивания–сворачивания под действием химических денатурантов – мо-

чевины или GdnHCl. Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что при использовании в качестве денатуранта GdnHCl необходимо учитывать некоторые особенности его взаимодействия с белками. Ряд полученных нами результатов (см. также Главу 3) подтверждает литературные данные о том, что GdnHCl при небольших концентрациях может оказывать на белки стабилизирующее действие [48, 49] за счет того, что он снимает существующие напряжения в белке, обусловленные электростатическим взаимодействием заряженных групп на его поверхности.

Наряду с фактами, свидетельствующими о стабилизирующем влиянии небольших добавок GdnHCl на структуру белков, на примере инактивированного актина показано, что этот денатурант может оказывать на белки агрегирующее действие (Пова-

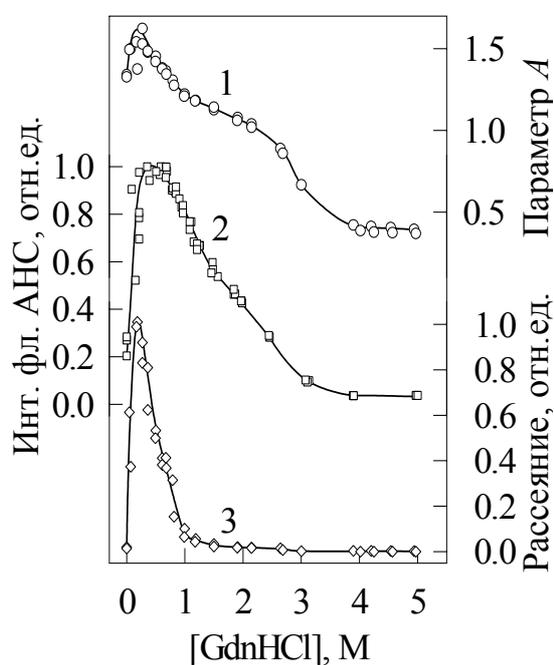


Рис. 4.4.1. Зависимость величины параметра A (1), интенсивности флуоресценции АНС (2) и светорассеяния (3) от концентрации GdnHCl для исходно инактивированного актина.

рова и др., 2005). Эффект резкого возрастания флуоресценции АНС и интенсивности светорассеяния для инактивированного актина в присутствии небольшой концентрации GdnHCl (рис. 4.4.1) объяснен взаимодействием катионов GdnHCl (GuH^+) с группами $\text{C}=\text{O}$ остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот, глутамина и аспарагина макромолекул актина, входящих в состав ассоциата. При этом происходит нейтрализация отрицательных зарядов карбоксильных групп глутаминовых и аспарагиновых аминокислот, а в местах локализации амидных групп глутамина и аспарагина возникают положительные заряды GuH^+ . С ростом числа ионов GuH^+ , связанных с ассоциатом, увеличивается количество положительных групп на его поверхности, и при некоторой концентрации GdnHCl в целом исходно отрицательно заряженный ассоциат ($\text{pI} = 5.07$) становится нейтральным. При этом создаются условия агрегации ассоциатов между собой. Это

и является причиной возрастания светорассеяния и связывания молекул АНС, которые встраиваются в гидрофобные полости между ассоциатами, образующими агрегаты. При дальнейшем увеличении концентрации GdnHCl число положительно заряженных групп на поверхности ассоциата начинает превышать число отрицательно заряженных групп. Наличие положительно заряженных групп на поверхности ассоциа-

тов препятствует их агрегации. Агрегаты, возникшие при меньших концентрациях GdnHCl, при этом диссоциируют.

Несомненно, существенную роль при образовании агрегатов инактивированного актина в присутствии GdnHCl играют гидрофобные взаимодействия. Интенсивность флуоресценции АНС в присутствии инактивированного актина приблизительно в 20 раз больше по сравнению с интенсивностью флуоресценции АНС в присутствии нативного актина той же концентрации. Это означает, что инактивированный актин (ассоциат) уже содержит гидрофобные кластеры на поверхности, но при этом эти ассоциаты не "слипаются", поскольку этому, на наш взгляд, препятствует отрицательный заряд на поверхности ассоциатов. Увеличение интенсивности флуоресценции АНС свидетельствует о связывании большего количества молекул АНС при агрегации инактивированного актина, что может быть как результатом более сильного экспонирования гидрофобных участков белка, так и возникновением новых гидрофобных карманов между ассоциатами, входящими в состав агрегатов инактивированного актина.

Подобного рода эффект, по-видимому, приводит к ассоциации (агрегации) молекул карбоангидразы при переходе в состояние типа расплавленной глобулы и проявляется в существенном возрастании интенсивности флуоресценции АНС и анизотропии собственной флуоресценции (Bushmarina et al., 2001, см. также раздел 3.3). В то же время эффект не носит универсального характера для белков, имеющих изоэлектрическую точку в кислой области рН. Для агрегации необходимо, чтобы имелись гидрофобные кластеры на поверхности, взаимодействие между которыми, по-видимому, и приводит к слипанию макромолекул в отсутствие электростатического отталкивания.

4.5. Спектральные свойства тиофлавина Т в растворителях различной вязкости и в составе амилоидных фибрилл. Тиофлавин Т как молекулярный ротор. Нарушение фолдинга белков в клетке может приводить к возникновению ряда тяжелых заболеваний, которым сопутствует (а, скорее, является причиной) переход определенного белка в особое состояние, обогащенное β -структурами, в котором этот белок образует так называемые амилоидные фибриллы. Исследования последних лет показали, что при соответствующих условиях в это состояние могут переходить очень многие белки, в том числе белки, изменение конформации которых пока не связывают с какими-либо заболеваниями. Морфологически, амилоидные фибриллы, образованные на основе самых разнообразных белков, имеют сходную структуру. Они представляют длинные неразветвленные структуры диаметром несколько нанометров, образованные перевитыми между собой протофибриллами, в которых β -слои ориентированы перпендикулярно оси фибриллы [9, 50]. Общепринятым приемом тестирова-

ния возникновения амилоидных фибрилл стало использование для этих целей флуоресцентного красителя тиофлавина Т (рис. 4.5.1), образующего с амилоидными фибриллами интенсивно флуоресцирующий комплекс (см. например, [13]; Воропай и др., 2003, и ссылки в этих работах; рис. 4.5.2). При этом тиофлавин Т не взаимодействует с белками в нативном, полностью развернутом и денатурированных частично-свернутых состояниях типа расплавленной глобулы, а также с аморфными агрегированными формами белков и специфически взаимодействует лишь с белками в состоянии амилоидных фибрилл. Благодаря уникальным флуоресцентным свойствам тиофлавина Т используется не только для диагностики возникновения амилоидных фибрилл в различных тканях и органах, но и при проведении исследования фибриллогенеза и свойств амилоидных фибрилл *in vitro* (см. например, [14-15, 51-52]) .

Остается невыясненным, каков механизм взаимодействия тиофлавина Т с амилоидными фибриллами и что является при этом причиной существенного возрастания квантового выхода флуоресценции тиофлавина Т. Для того, чтобы ответить на эти вопросы, в настоящей работе было предпринято детальное изучение влияния диэлектрических характеристик и вязкости растворителя на флуоресценцию тиофлавина Т, выполнен квантово-химический расчет геометрии молекулы тиофлавина Т в основном и возбужденном состоянии, проведены исследования взаимодействия тиофлавина Т с циклодекстринами, моделирующего встраивание тиофлавина Т в амилоидные фибриллы.

Квантово-химический расчет молекулы тиофлавина Т в основном состоянии показал, что наличие метильной группы, присоединенной к атому азота бензтиазольного кольца, препятствует существованию строго планарной конформации колец, обуславливает существование барьера при $\varphi = 0$ (180°) и увеличивает энергию молекулы тиофлавина Т в основном состоянии, тем самым уменьшая величину энергетического барьера при $\varphi = 90$ (270°) между конформациями тиофлавина Т, отвечающими минимуму энергии (рис. 4.5.3). При φ близких к 90 и 270° система сопряженных связей тиофлавина Т распадается на π -сопряженные системы бензтиазольного и аминокбензольного колец, которые могут при этом выступать как независимые хромофоры. Барьер невысок и, поэтому в основном состоянии значительная доля молекул будет иметь конформацию с несвязанными бензтиазольным и аминокбензольным кольцами. Известно, что по мере увеличения размеров системы π -сопряженных связей спектр сдвигается в длинноволновую сторону. Поэтому любой из фрагментов тиофлавина Т, например бензтиазольное кольцо, должен иметь более коротковолновый спектр поглощения (и флуоресценции) по сравнению с тиофлавином Т.

Значительное содержание молекул тиофлавина Т с нарушенной системой π -сопряженных связей в основном состоянии позволяет объяснить ряд, до сих пор не

понятых и объясняемых существованием примесей, особенностей спектров возбуждения флуоресценции и спектров флуоресценции красителя (см., например, Воропай и др. 2003; [13]). В частности, существование у тиофлавина Т в водном растворе и в спиртах полосы флуоресценции с максимумом около 440 нм, имеющей спектр возбуждения флуоресценции с максимумом при приблизительно 340-350 нм, а также сложный характер спектра возбуждения флуоресценции при регистрации в области 480 нм (рис. 4.5.4), можно объяснить сосуществованием молекулы тиофлавина Т и ее фрагментов в основном состоянии.

Есть все основания полагать, что низкая величина энергетического барьера при $\varphi = 90$ (270) $^\circ$ между состояниями, отвечающими минимуму энергии в основном состоянии, будет присуща молекулам тиофлавина Т также и в возбужденном состоянии. В таком случае поворотная релаксация фрагментов молекулы тиофлавина Т друг относительно друга в возбужденном состоянии, приводящая к нарушению системы сопряженных связей, должна являться основным процессом безызлучательной дезактивации возбужденного состояния тиофлавина Т. Молекулы, у которых безызлучательная дезактивация возбужденного состояния связана с поворотами фрагментов молекулы друг относительно друга, получили название молекулярных роторов.

Константа скорости преодоления активационного барьера внутреннего вращения в 700 см^{-1} при $T = 300 \text{ К}$ составляет $k = 2.18 \cdot 10^{11} \text{ сек}^{-1}$, т.е. отдельная молекула преодолевает такой барьер в среднем 200 раз за одну наносекунду. Эта оценка справедлива, конечно, только для изолированных молекул в вакууме. В растворителе вращательная релаксация фрагментов молекулы тиофлавина Т друг относительно друга требует одновременного кооперативного движения молекул растворителя, препятствующего вращению фрагментов, т.е. будет определяться вязкостью растворителя и гидродинамическими характеристиками фрагментов тиофлавина Т.

Исследование зависимости квантового выхода флуоресценции тиофлавина Т (Φ) от вязкости (η) и температуры (T) позволило определить характерное время достижения молекулой конформации с φ близким к 90 или 270° и энергию активации процесса безызлучательного перехода тиофлавина Т в основное состояние. Для тиофлавина Т в 99 % глицерине энергия активации $\Delta E = 4700 \pm 300 \text{ см}^{-1}$ оказалась близкой к энергии активации вязкого течения глицерина $\Delta E(\eta) = 5200 \text{ см}^{-1}$ [53]. Линейный характер зависимости $1/\Phi - 1$ для тиофлавина Т в водно-глицериновых растворах при 293 К от T/η (рис. 4.5.5) также свидетельствует о том, что константа скорости достижения молекулой тиофлавина Т конформации, при которой нарушается единая система π -сопряженных связей бензтиазольного и аминобензольного колец, определяется не барьером внутреннего вращения, а вязкостью растворителя.

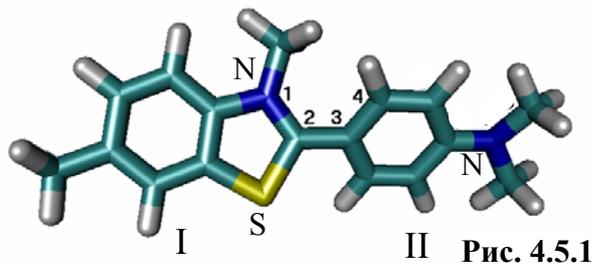


Рис. 4.5.1

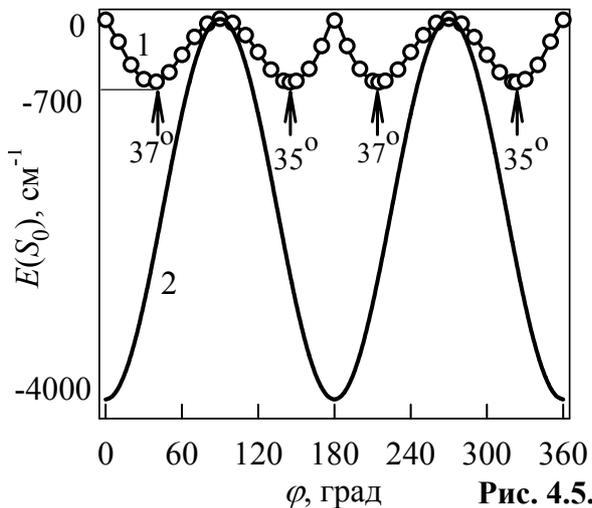


Рис. 4.5.3

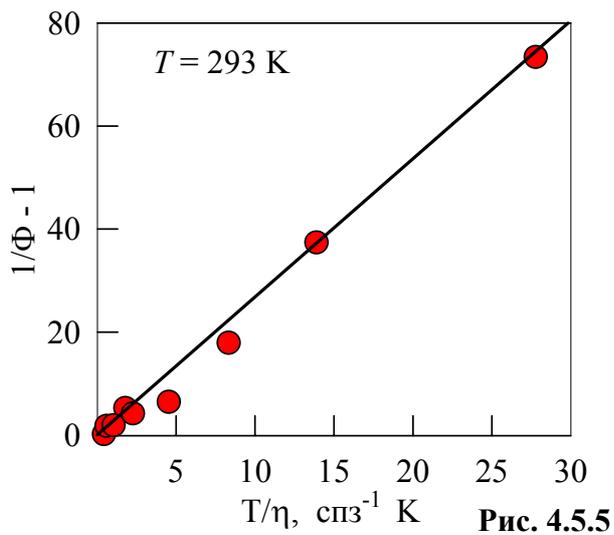


Рис. 4.5.5

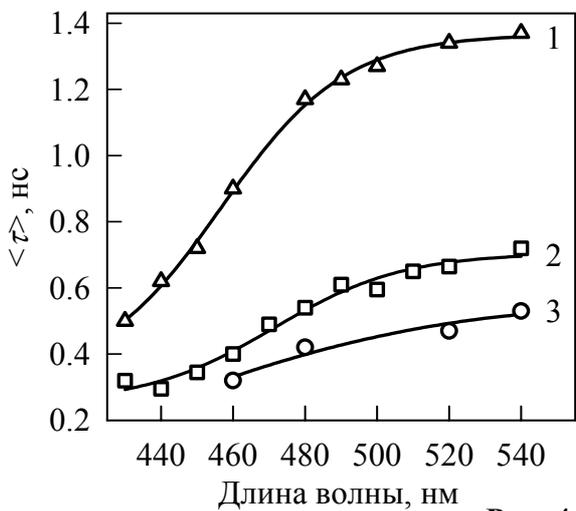


Рис. 4.5.7

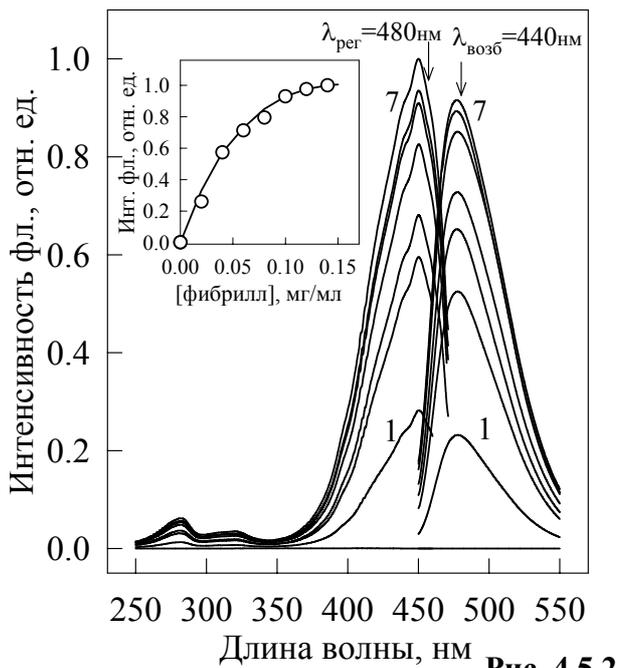


Рис. 4.5.2

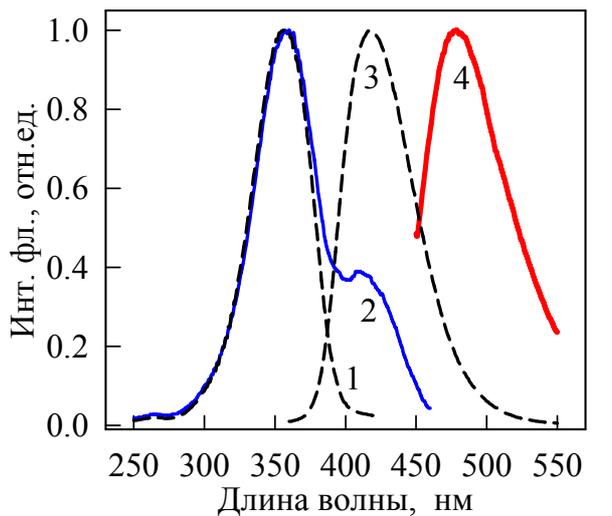


Рис. 4.5.4

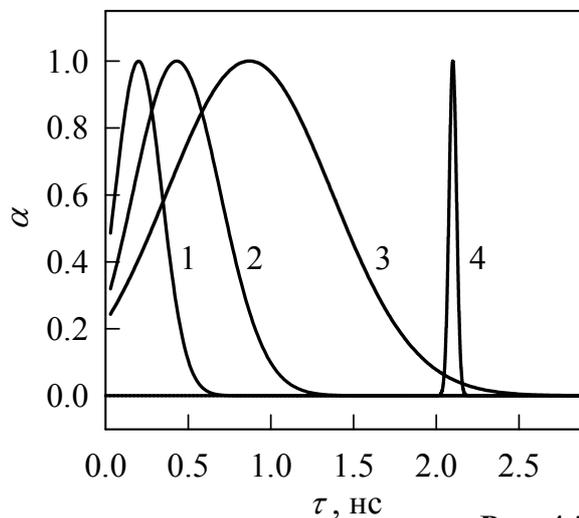


Рис. 4.5.6

Рис. 4.5.1. Пространственная модель молекулы тиофлавина Т (ThT). Показаны атомы S, C и N. Выделены два фрагмента молекулы ThT: бензтиазольное (I) и аминобензольное кольцо (II). Угол φ между бензтиазольным и аминобензольным кольцами определяется как угол между плоскостями, в которых лежат атомы 1, 2, 3 и 2, 3, 4.

Рис. 4.5.2. Спектры возбуждения флуоресценции и флуоресценции ThT, инкорпорированного в амилоидные фибриллы. Представлены спектры возбуждения флуоресценции ($\lambda_{\text{рег}} = 480$ нм) и флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 440$ нм) ThT в присутствии инсулиновых фибрилл в концентрации от 0.02 до 0.14 мг/мл с шагом 0.02 мг/мл (кривые 1–7, соответственно). Вставка: зависимость интенсивности флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 440$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 480$ нм) от концентрации амилоидных фибрилл. Концентрация ThT – 0.5 мкМ.

Рис. 4.5.3. Влияние присоединения метильной группы к атому азота бензтиазольного кольца на зависимость потенциальной энергии молекулы ThT от угла φ между плоскостями бензтиазольного и аминобензольного колец. Расчет выполнен с помощью метода AM1 для ThT (1) и для ThT в отсутствие метильной группы (2). Метильная группа придает молекуле ThT свойства, присущие молекулярным роторам.

Рис. 4.5.4. Спектры возбуждения флуоресценции (1 – $\lambda_{\text{рег}} = 480$ нм; 2 – $\lambda_{\text{рег}} = 440$ нм) и флуоресценции (3 – $\lambda_{\text{возб}} = 340$ нм; 4 – $\lambda_{\text{возб}} = 440$ нм) ThT и этаноле. Концентрация ThT – 0.5 мкМ.

Рис. 4.5.5. Зависимость квантового выхода флуоресценции ThT от вязкости растворителя (водно-глицериновые смеси).

Рис. 4.5.6. Распределение молекул ThT по времени затухания флуоресценции. Растворитель – 99% глицерин. Кривые 1, 2 и 3 измерены при температуре 300, 289.5, и 278 К. Кривая 4 – распределение по времени затухания флуоресценции для ThT в пропанолу при 77 К. $\lambda_{\text{возб}} = 440$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 480$ нм.

Рис. 4.5.7. Зависимость среднего времени затухания флуоресценции ThT в глицерине (99%) при температуре 278 (1), 293 (2) и 296 К (3).

Однако, время, необходимое для достижения тиофлавином Т конформации, при которой угол φ становится близким к 90° или 270° (3.0 нс), в десятки раз меньше времени вращательной релаксации фрагмента молекулы тиофлавина Т, которое, по нашим оценкам, составляет приблизительно 220 нс. Но, это вполне понятно, поскольку фотофизические свойства молекул тиофлавина Т будут определяться не временем вращательной релаксации фрагментов молекулы друг относительно друга, а временем, в течение которого в среднем каждая молекула тиофлавина Т за счет торсионных колебаний достигает конформации, при которой угол φ между бензтиазольным и аминобензольным кольцами примет значение близкое к 90° или 270° .

Флуоресцентные свойства тиофлавина Т должны определяться в значительной степени соотношением времени достижения молекулой конформации со значением φ близким к 90° или 270° (τ_{or}), радиационного времени жизни (τ_r) и времени вращательной релаксации растворителя (τ_{solv}). Если $\tau_{or} \ll \tau_r$ (вода, спирты) или $\tau_{or} \gg \tau_r$ (пропнол, 77 К), то распределение молекул тиофлавина Т по времени жизни возбужденного состояния α (τ) будет узким (рис. 4.5.6, кривые 1 и 4).

В водно-глицериновых растворах (с достаточно низким содержанием воды) при соответствующей температуре могут создаваться условия, когда τ_{or} будет сопоставимо по величине с τ_r . При этом за излучение будут ответственны молекулы тиофлавина Т, существенно различающиеся по величине угла φ между бензтиазольным и аминобезольными кольцами и по времени жизни в возбужденном состоянии (рис. 4.5.6, кривые 2 и 3). Если, к тому же, τ_{solv} по величине близко к τ_r и τ_{or} , то для флуоресценции тиофлавина Т будут наблюдаться эффекты, характерные для систем с так называемым неоднородным уширением спектра. В частности, будет иметь место значительное изменение среднего времени жизни возбужденного состояния в пределах спектра флуоресценции, что реально и наблюдается (рис. 4.5.7). Необходимо отметить, что в этих условиях, несмотря на существенные изменения среднего времени жизни флуоресценции по спектру излучения, величина степени поляризации остается при этом неизменной и высокой ($P = 0.4$). Это означает, что время вращательной релаксации молекулы тиофлавина Т много больше времени торсионных колебаний фрагментов молекулы тиофлавина Т друг относительно друга, приводящих к безызлучательной дезактивации, а направление дипольного момента перехода молекулы тиофлавина Т совпадает с осью вращения фрагментов молекулы друг относительно друга.

Все представленные выше данные позволяют сделать вывод о том, что флуоресцентные свойства тиофлавина Т характерны для соединений, получивших название молекулярных роторов, и что причиной существенного возрастания квантового выхода флуоресценции тиофлавина Т при его инкорпорации в амилоидные фибриллы является жесткость окружения, препятствующая повороту бензтиазольного и аминобензольного колец друг относительно друга в возбужденном состоянии (Воропай и др., 2003; Маскевич и др., 2004).

Выводы

1. Путь разворачивания, последовательность образования и число возникающих денатурированных частично-свернутых состояний каждого конкретного белка не зависят от характера денатурирующего воздействия и стабилизации структуры при связывании лиганда.
2. Способность белков к одностадийному обратимому разворачиванию нельзя однозначно связывать с их размером и мультидоменностью.
3. Вновь обнаруженные промежуточные состояния актина N^* и U^* являются кинетическими интермедиатами на пути разворачивания–сворачивания актина, в то время как инактивированный актин, ранее считавшийся промежуточным состоянием белка, на самом деле является моодисперсным ассоциатом, образование которого препятствует правильному сворачиванию белка *in vitro*. На основании этих данных предложена принципиально новая схема процессов разворачивания–сворачивания глобулярного актина.
4. При определенных условиях GdnHCl может вызывать агрегацию белков. Этот эффект, обнаруженный при исследовании инактивированного актина и объясненный изменением заряда инактивированного актина за счет взаимодействия катионов GdnHCl (GuH^+) с группами C=O, необходимо учитывать в работах по изучению фолдинга белков при использовании GdnHCl в качестве денатуранта.
5. Четвертичная структура является существенным, но не единственным фактором, определяющим различия в стабильности зеленых и красных флуоресцентных белков.
6. Малые концентрации GdnHCl (около 0.1 М) вызывают изменение структуры креатинкиназы, актина, флуоресцентных белков. Эффект объяснен стабилизирующим действием денатуранта. В случае креатинкиназы – это первое подтверждение физико-химическими методами изменения структуры фермента в этой области концентраций денатуранта, ранее установленное по изменению его каталитической активности.
7. Причиной значительного возрастания (на несколько порядков) квантового выхода флуоресценции тиофлавина Т при его встраивании в амилоидные фибриллы является жесткость окружения, препятствующая повороту фрагментов молекулы друг относительно друга в возбужденном состоянии. Флуоресцентные свойства тиофлавина Т характерны для соединений, относящихся к классу молекулярных роторов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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.
2. Туроверов К.К., Бушмарина Н.А., Малова Л.Н., **Кузнецова И.М.** 2001. Собственная УФ-флуоресценция лизоцима и микроокружение его триптофановых остатков. *Биофизика* 46, 978-987.
3. Воропай Е.С., Самцов М.П., Каплевский К.Н., Маскевич А.А., Степура В.И., Поварова О.И., **Кузнецова И.М.**, Туроверов К.К., Финк А.Л. и Уверский В.Н. 2003. Спектральные свойства тиофлавина Т и его комплексов с амилоидными фибриллами. *Ж. прикл. спектр.* 70, 767-773.
4. Мажуль В.М., Зайцева Е.М., Шавловский М.М., **Кузнецова И.М.**, Туроверов К.К. 2003. Кинетика инактивации актина: анализ методом триптофановой фосфоресценции при комнатной температуре. *Биофизика.* 48, 837-843.
5. Маскевич А.А., Легеда М.В., Туроверов К.К., **Кузнецова И.М.** 2004. Флуоресцентные свойства тиофлавина Т при его встраивании в γ -циклодестрин. В сб.: Молекулярные мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. Ред. И.Д.Волотовский и С.Н.Черенкевич. ч. II., стр.30-32.
6. **Кузнецова И.М.**, Форже В., Туроверов К.К. 2005 а. Структурная динамика, стабильность и фолдинг белков. *Цитология.* 47, 943-952.
7. Поварова О.И., **Кузнецова И.М.**, Туроверов К.К. 2005. Физико-химические свойства актина в различных структурных состояниях. Новые представления о процессах его сворачивания – разворачивания. *Цитология.* 47, 953-977.
8. Мажуль В.М., Зайцева Е.М., Шавловский М.М., Поварова О.И., **Кузнецова И.М.**, Туроверов К.К. 2005. Фосфоресценция при комнатной температуре аморфных агрегатов и амилоидных фибрилл, образующихся в результате неправильного фолдинга белков. *Цитология.* 47, 978-987.
9. Степаненко Ольга В., **Кузнецова И.М.**, Туроверов К.К., Скогнамиглио В. , Стаяно М. и Д'Ариа С. 2005 а. Структура и стабильность глутамин-связывающего белка из *Escherichia coli* и его комплекса с глутамином. *Цитология.* 47, 988-1006.

10. **Кузнецова И.М.**, Степаненко Ольга В., Туроверов К.К., Хуанг Ч., Ванг Ч.-Ч. 2005б. Конформационные изменения дисульфидизомеразы С под действием гуанидингидрохлорида. *Цитология* 47, 1007-1016.
11. Степаненко Олеся В., Верхуша В.В., Шавловский М.М., Алейникова Т.Д., Уверский В.Н., **Кузнецова И.М.**, Туроверов К.К. 2005 б. Роль четвертичной структуры в стабилизации флуоресцентных белков. *Цитология* 47, 1017-1027.
12. **Kuznetsova I. M.**, A.G. Biktashev, L.N. Malova, N.A. Bushmarina, V.N. Uversky, and K.K.Turoverov. 2000. Understanding the contribution of individual tryptophan residues to intrinsic lysozyme fluorescence. *Protein and Peptide Letters* 7, 411-420.
13. Bushmarina N.A., **Kuznetsova I.M.**, Biktashev A.G., Turoverov K.K., and Uversky V.N. 2001. Partially folded conformations in the folding pathway of bovine carbonic anhydrase II: a fluorescence spectroscopic analysis. *ChemBioChem* 2, 812-821.
14. **Kuznetsova I.M.**, Stepanenko O.V., Turoverov K.K., Zhu L., Zhou J.-M, Fink A.L., and Uversky V.N. 2002 a. Unravelling multistate unfolding of rabbit muscle creatine kinase. *Biochem. Biophys. Acta.* 1596, 138-155.
15. Turoverov K.K., Verkhusha V.V., Shavlovsky M.M., Biktashev A.G., Povarova O.I., and **Kuznetsova I.M.** 2002 a. Kinetics of actin unfolding induced by guanidine hydrochloride. *Biochemistry* 41, 1014-1019.
16. **Kuznetsova I.M.**, Stepanenko Olga V., Stepanenko Olesia V., Povarova O.I., Biktashev A.G., Verkhusha V.V., Shavlovsky M.M., and Turoverov K.K. 2002 b. The place of inactivated actin and its kinetic predecessor in actin folding-unfolding. *Biochemistry* 41, 13127-13132.
17. Turoverov K.K., **Kuznetsova I.M.**, and Uversky V.N. 2002 b. Capture of intermediates in protein unfolding-refolding reactions by fluorescence diagram method. *Recent Res. Devel. Biophys.* 1, 101-119.
18. Turoverov K.K. and **Kuznetsova I.M.** 2003. Intrinsic fluorescence of actin. *J. Fluorescence.* 13, 41-57.
19. Verkhusha V.V., Shavlovsky M.M., Nevzglyadova O.V., Gaivoronsky A.A., Artemov A.V., Stepanenko Olga V., **Kuznetsova I.M.**, and Turoverov K.K. 2003 a. Expression of recombinant fusion protein GFP-actin in the methylotrophic yeast *Pichia Pastoris*. *FEMS Yeast Res.* 3, 105-111.

20. Verkhusha V.V., **Kuznetsova I.M.**, Stepanenko Olesia V., Zaraisky A.G., Shavlovsky M.M., Turoverov K.K., and Uversky V.N. 2003 *b*. High stability of Discosoma DsRed as compared to Aequorea EGFP. *Biochemistry* 42, 7879-7884.
21. Mazhul' V.M., Zaitseva E.M., Shavlovsky M.M., Stepanenko Olesia V., **Kuznetsova I.M.**, and Turoverov K.K. 2003. Monitoring of Actin Unfolding by Room Temperature Tryptophan Phosphorescence. *Biochemistry*. 42, 13551-13557.
22. Stepanenko Olga V., **Kuznetsova I.M.**, Turoverov K.K., Chunjuan H. and Wang C.-C. 2004 *a*. Conformational change of dimeric DsbC molecule induced by GdnHCl - A study by intrinsic fluorescence. *Biochemistry* 43, 5296-5303.
23. **Kuznetsova I.M.**, Turoverov K.K., Uversky V.N. 2004. Use of phase diagram method to analyze the protein unfolding-refolding reactions: fishing out the "invisible" intermediates. *J. Proteome Res.* 3, 485-494.
24. Giordano A., Raia C.A., **Kuznetsova I.M.**, Stepanenko Olga V., Turoverov K.K. 2004. Highly absorbing in UV region complex in selenomethionine-substituted Alcohol Dehydrogenase from *Sulfolobus solfataricus*. *J. Proteome Res.* 3, 613-620.
25. Stepanenko Olesia V., Verkhusha V.V., Kazakov V. I., Shavlovsky M. M., **Kuznetsova I.M.**, Uversky V.N., Turoverov K.K. 2004 *b*. Understanding the Effect of Quaternary Structure on Conformational Stability of Fluorescent Proteins: Comparative Studies on EGFP, zFP506, mRFP1, "dimer2", and DsRed1. *Biochemistry*. 43, 14913-14923.
26. D'Auria S., Staiano M., **Kuznetsova I.M.** , Turoverov K.K. 2005. How the combined use of fluorescence spectroscopy and X-ray crystallography contributes to elucidate structure and dynamics of proteins. *Reviews in Fluorescence*. 25-61.
27. Staiano M., Scognamiglio V., Rossi M., D'Auria S., Stepanenko Olga V., **Kuznetsova I.M.**, Turoverov K.K. 2005. Unfolding-refolding of glutamine-binding protein from *Escherichia coli* and its stabilization by glutamine. *Biochemistry* 44, 5625-5633.
28. **Kuznetsova I.M.**, Stepanenko Olga V., Turoverov K.K., Scognamiglio V., Staiano M., Rossi M., and D'Auria S. 2005. Fluorescence properties of glutamine-binding protein from *Escherichia coli* and its complex with glutamine. *J. Proteome Res.* 4, 417-423.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frankel S., Condeelis J., Leinwand L. 1990. *J. Biol. Chem.* 265, 17980-17987.
2. Wetzel R. 1994. *Trends Biotechnol.* 12, 193-198.
3. Speed M. A., Wang D. I., King J. 1996. *Nat. Biotechnol.* 14, 1283-1287.
4. Fink A.L. 1998. *Fold Des.* 3, 9-23.
5. Kelly J. W. 1997. *Structure* 5, 595-600.
6. Kelly J. W. 2000. *Nature Struct. Biol.* 7, 824-826.
7. Uversky V. N., Talapatra A., Gillespie J. R., Fink, A. L. 1999. *Med. Sci. Monitor.* 5, 1001-1012, 1238-1254.
8. Carrell, R. W., Gooptu, B. 1998. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 799-809.
9. Dobson C.M. 2003. *Nature* 18, 884-890.
10. Dobson C.M. 2004. *Methods* 34, 4-14.
11. Harper J. D., Lansbury P. T. Jr. 1997. *Ann. Rev. Biochem.* 66, 385-407.
12. Гусев Н.Б. 2004. *СОЖ*, 8, 15-23.
13. LeVine H. 3rd. 1999. *Methods Enzymol.* 309, 274-84.
14. Goers J., Permyakov S.E., Permyakov E.A., Uversky V.N., Fink A.L. 2002. *Biochemistry* 41, 12546-12551.
15. Ban T., Hamada D., Hasegawa K., Naiki H., Goto Y. 2003. *J Biol Chem.* 278, 16462-16465.
16. Капланас Р.И., Буколова Т.Г., Бурштейн Э.А. 1975. *Мол. биол.*, 9, 795-804.
17. Бурштейн Э. А. 1976. Люминесценция белковых хромофоров. *Сер. Биофиз*, Т.7, ВИНТИ, Москва
18. Altschuler G. M., Klug D.R., Willison K.R. 2005. *J Mol. Biol.* 353, 385-96.
19. Das P., Wilson C. J., Fossati G., Wittung-Stafshede P., Matthews K.S., and Clementi C. 2005. *PNAS* 102 (41), 14569–14574.
20. Bernstein F.C., et al. 1977. *J. Mol. Biol.* 112, 535-542.
21. Hsiao C.-D., Sun Y.-J., Rose J., Wang B.-C. 1996. *J. Mol. Biol.* 262, 225–242.
22. Sun Y.J., Rose J., Wang B.C., Hsiao C.D. 1998. *J. Mol. Biol.* 278, 219–229.
23. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. 1996. *J.Molec. Graphics.* 14, 33-38.
24. Merritt E.A., Bacon D.J. 1977. *Methods Enzymol.* 277, 505-524.
25. D'Auria S., et al., 2005. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* 58, 80-87.
26. Levitsky D.I., Kremneva E., Nikolaeva O., Maytum R., Geeves M.A. 2005. *Biophys.J.*, 88, p.657.
27. Пермяков Е.А. 1993. Кальций-связывающие белки. Наука, Москва, 190стр.
28. Rao J.K., Bujacz G., Wlodawer A. 1998. *FEBS Lett.*, 439, 133-137.
29. Fan Y.-X., Zhou J.-M., Kihara H., Tsou C.-L. 1998. *Protein Sci.* 7, 2631-2641.
30. Saito R., Sato T., Ikai A., Tanaka N. 2004. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 60, 792-795.
31. Родионова Н.А., Семисотнов Г.В., Кутышенко В.П., Уверский В.Н., Болотина И.А. 1989. *Мол. биол.* 23, 683-692.
32. McCarthy A.A., Haebel P.W., Torronen A., Rybin V., Baker E.N., Metcalf P. 2000. *Nat. Struct. Biol.* 7, 196-199.
33. Kabsch W., Mannherz H. G., Suck D., Pai E. F., Holmes H. C. 1990. *Nature* 347, 37-44.
34. Lewis et al., 1963; Lehrer S. L., Kerwar G. 1972. *Biochemistry.* 11, 1211-1217.
35. Bertazzon A., Tian G. H., Lamblin A., Tsong T. Y. 1990. *Biochemistry* 29, 291-298.
36. Schuler H., Lindberg U., Schutt C. E., Karlsson R. 2000. *Eur. J. Biochem.* 267, 476-486.
37. Turoverov K. K., Biktashev A. G., Khaitlina S. Yu., Kuznetsova I. M. 1999a. *Biochemistry.* 38, 6261-6269.
38. Turoverov K. K., Kuznetsova I. M., Khaitlina S. Yu., and Uversky V.N. 1999b. *Protein and Peptide Letters.* 6, 73-78.
39. Kuznetsova I. M., Khaitlina S. Yu., Konditerov S. N., Surin A. M., Turoverov K. K. 1988. *Biophys. Chem.* 32, 73-78.
40. Kuznetsova I. M., Biktashev A.G., Khaitlina S.Yu., Vassilenko K.S., Turoverov K.K., Uversky V. N. 1999a. *Biophys. J.* 77, 2788-2800.

41. Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Uversky V. N. 1999b. *Protein Peptide Lett.* 6, 173-178.
42. Kuznetsova I. M., Yakusheva T. A., Turoverov K. K. 1999c. *FEBS Lett.* 452, 205-210.
43. Tsien R. Y. 1998. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509-544.
44. Permyakov E.A., Yarmolenko V.V., Emelyanenko V.I., Burstein E. A., Closset J., Gerday C. 1980. *Eur. J. Biochem.* 109: 307-315.
45. Мажуль В.М., Конев С.В., Ермолаев Ю.С., и др.1983. *Биофизика.* 28, 980 –983.
46. Vanderkooi J.M. 1992. In: *Topics in fluorescence spectroscopy.* New York: Plenum Press, 3, 113-136.
47. Axelsen P.H., Bajzer Z., Prendergast F.G., Cottam P.F., Ho C. 1991. *Biophys.J.* 60, 650–659.
48. Monera O.D., Kay C.M., Hodges R.S. 1994. *Protein Sci.* 3, 1984-1991.
49. Bhuyan A.K., 2002. *Biochemistry*, 41, 13386-13394.
50. Dumoulin M. and Dobson C.M. 2004. *Biochimie.* 86, 589-600.
51. Kumita J. R., Weston C. J., Choo-Smith L. P., Woolley G. A., O. S. Smart. 2003. *Biochemistry.* 42, 4492-4498.
52. Zhu L., Zhang X. J., Wang L. Y., Zhou J. M., Perrett S. 2003. *J Mol Biol.* 328, 235-254.
53. Loutfy R.O., Arnolds B. A. 1982. *J. Phys. Chem.* 86: 4205-4211.