

ФОСФОРЕСЦЕНЦИЯ ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ АМОРФНЫХ АГРЕГАТОВ И АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ, ОБРАЗУЮЩИХСЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ НЕПРАВИЛЬНОГО ФОЛДИНГА БЕЛКОВ

© В. М. Мажуль,¹ Е. М. Зайцева,¹ М. М. Шавловский,²
О. И. Поварова,³ И. М. Кузнецова,³ К. К. Туроверов^{3,*}

¹ Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,

² Институт экспериментальной медицины РАМН и ³ Институт цитологии РАН,
Санкт-Петербург, Россия;

* электронный адрес: kkt@mail.cytspb.rssi.ru

На примере актина, α -лактальбумина и инсулина показано, что образование аморфных агрегатов белков и амилоидных фибрилл приводит к увеличению жесткости микроокружения триптофановых и тирозиновых остатков и появлению триптофановой (тирозиновой) фосфоресценции при комнатной температуре (ФКТ). Метод, основанный на регистрации ФКТ, использован для изучения медленной внутримолекулярной динамики нативного (G- и F-формы) и инактивированного (I) актина из мышц кролика и кинетики ее изменения в процессе разворачивания белка под действием гуанидингидрохлорида (GdnHCl). С использованием этого метода подтвержден ранее сделанный вывод о том, что образованию инактивированного актина предшествует возникновение существенно развернутого кинетического интермедиата белка. Показано, что этот кинетический интермедиат актина не фосфоресцирует при комнатной температуре, и это свидетельствует о высокой лабильности структуры белка. Симбатное возрастание интегральной интенсивности (относительного квантового выхода) и среднего времени затухания ФКТ в процессе превращения актина из существенно развернутого состояния (U^*) в I свидетельствует о том, что этот процесс осуществляется путем постепенного наращивания массы образующегося ассоциата ($U^* \rightarrow I_1 \rightarrow \dots \rightarrow I_n \rightarrow \dots \rightarrow I_{15}$), сопровождающегося увеличением жесткости белковой структуры. Показано, что скорость образования инактивированного актина, представляющего собой моносферный ассоциат, состоящий из 15 макромолекул белка, возрастает с увеличением концентрации белка. Установлено, что переход актина в инактивированное состояние независимо от способа инактивации (1—2 M GdnHCl или 3.0—3.5 M мочевины, отщепление Ca^{2+} , инкубация при 70 °C, рефолдинг из полностью развернутого состояния путем диализа из раствора 8 M мочевины или 6 M GdnHCl) сопровождается значительным возрастанием как интегральной интенсивности, так и среднего времени затухания ФКТ, что свидетельствует о жесткости структуры инактивированного актина. Установлена зависимость различных характеристик ФКТ инактивированного актина от содержания GdnHCl в растворе. Показано, что время затухания ФКТ инактивированного актина не зависит от концентрации GdnHCl в интервале от 0 до 4 M. На примере инсулина и α -лактальбумина показано, что метод ФКТ может быть использован для изучения фибриллогенеза и исследования амилоидных фибрилл.

Ключевые слова: фосфоресценция при комнатной температуре, амилоидные фибриллы, актин, фолдинг белков, α -лактальбумин, инсулин.

Принятые сокращения: ФКТ — фосфоресценция при комнатной температуре, GdnHCl — гуанидингидрохлорид, КД — круговой дихроизм.

Вопрос о том, как белки сворачиваются в уникальное компактное, высокоорганизованное, функционально активное состояние, является одним из центральных вопросов физико-химической и клеточной биологии. Традиционным подходом к решению этой проблемы является изучение процессов сворачивания—разворачивания белков и свойств возникающих при этом промежуточных частично свернутых и неправильно свернутых состояний. Сворачивание—разворачивание белков часто сопровождается агрегацией или ассоциацией частично свернутых промежуточных состояний, а в некоторых случаях возникновением амилоидных фибрилл (Carrell,

Gooptu, 1998; Fink, 1998; Herrmann, Aebi, 1998). В настоящее время для все большего числа белков удается подобрать условия, при которых белок переходит в это структурное состояние *in vitro*.

Исследование процессов агрегации (ассоциации) белков и фибриллогенеза имеет не только фундаментальное значение для решения проблемы фолдинга белков, но также и большое практическое значение для медицины (в связи с существованием так называемых конформационных болезней, связанных с нарушением фолдинга белка (Harper, Lansbury 1997; Kelly, 1997; Carrell, Gooptu, 1998; Fink, 1998; Hashimoto, Masliah, 1999;

Koo et al., 1999; Uversky et al., 1999a, 1999b)) и биотехнологии (в связи с возникновением неправильно свернутых агрегированных форм рекомбинантных белков и накоплением их в телах включения (Wetzel, 1994; Fink, 1998)). Накопление амилоидных фибрилл *in vivo* приводит к развитию ряда тяжелых заболеваний, таких как нейродегенеративные заболевания Альцгеймера и Паркинсона, катаракта, злокачественная миелома, прионные болезни и др. (Harper, Lansbury, 1997; Kelly, 1997; Carrell, Gooptu, 1998; Fink, 1998; Hashimoto, Masliah, 1999; Koo et al., 1999; Uversky et al., 1999a). Перспективным методическим подходом для изучения аморфных агрегатов и амилоидных фибрилл может стать измерение интегральной интенсивности (относительного квантового выхода) и времени затухания ФКТ естественных хромофоров белка — триптофановых и тирозиновых остатков.

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 большинство белков в растворе не фосфоресцирует при комнатной температуре (Mazhul et al., 1983). Это обусловлено тем, что в этих условиях не достигается необходимой жесткости микроокружения триптофановых (тирозиновых) остатков. ФКТ белков в миллисекундном и секундном диапазонах имеет место в тех случаях, когда их хромофоры находятся в микроокружении с высокой жесткостью. Возрастание внутримолекулярной динамики усиливает безызлучательную дезактивацию триплетных состояний, обусловленную непланарной деформацией индольного (Trp) и фенольного (Tyr) колец за счет их соударений с окружающими конструкционными элементами глобулы.

Выраженная зависимость значений квантового выхода и времени затухания фосфоресценции от молекулярной подвижности окружения хромофоров и соответствие времен затухания ФКТ характерным временам низкочастотных флуктуаций структуры макромолекул белков позволяют использовать ФКТ для изучения внутримолекулярной подвижности белков, в том числе для изучения медленной внутримолекулярной подвижности миллисекундного и секундного диапазонов. Мы предположили, что агрегация белков или их переход в состояние амилоидных фибрилл может приводить к существенному увеличению жесткости микроокружения триптофановых и тирозиновых остатков и возникновению ФКТ. В частности, было сделано предположение о том, что инактивированный актин должен фосфоресцировать при комнатной температуре.

Впервые инактивированный актин был охарактеризован в работе Лерера и Кервера (Lehrer, Kerwar, 1972), которые показали, что отщепление катиона кальция приводит к необратимому переходу актина в денатурированное состояние, в котором актин не способен к полимеризации. Это состояние белка получило название инактивированного актина. Позднее было показано, что переход актина в инактивированное состояние происходит не только при отщеплении иона Ca^{2+} , но и под действием повышенных температур (60—70 °C), умеренных концентраций мочевины (3.0—3.5 М) или GdnHCl (0.8—2.0 М), при диализе из 8 М мочевины или 6 М GdnHCl и даже спонтанно при длительном хранении

(Nagy, Jencks, 1962; Lehrer, Kerwar, 1972; Nagy, Strzelecka-Golaszewska, 1972; Strzelecka-Golaszewska et al., 1974; Contaxis et al., 1977; Kuznetsova et al., 1988; Bertazzon et al., 1990; Le Bihan, Gicquaud, 1993; Turoverov et al., 1999; Schuler et al., 2000). Инактивированный актин представляет собой термодинамически стабильный монодисперсный ассоциат, состоящий из 15 мономеров (Kuznetsova et al., 1999a). Свойства инактивированного актина не зависят от того, каким образом он был получен (Kuznetsova et al., 1999b, Turoverov et al., 1999). Особенностью структуры инактивированного актина является значительное ограничение наносекундной внутримолекулярной подвижности триптофановых остатков по сравнению с их подвижностью в G-актине (данные триптофановой флуоресценции), а также подвижности микроокружения триптофановых остатков (данные измерения КД в ближней УФ-области спектра) (Kuznetsova et al., 1999b, Turoverov et al., 1999).

В последнее время установлено, что инактивированный актин не является промежуточным состоянием между нативным и полностью развернутым состояниями (Turoverov et al., 2002). На основании данных, полученных методом триптофановой флуоресценции и КД, был сделан вывод о том, что нативный G-актин (N) переходит в инактивированное состояние (I) не непосредственно, а через промежуточную стадию, характеризующуюся образованием существенно более быстрого кинетического интермедиата белка (Kuznetsova et al., 2002). В отличие от полностью развернутого состояния актин в существенно развернутом состоянии (U^*) сохраняет вторичную структуру. Состояние U^* возникает не только на пути денатурации нативного белка, но и при рефолдинге из полностью развернутого состояния (U) (Kuznetsova et al., 2002).

Спектральные и кинетические характеристики триптофановой фосфоресценции G- и F-актина в растворе при низких и комнатной температурах были охарактеризованы ранее (Horie, Vanderkooi, 1982; Strambini, Lehrer, 1991). Однако метод ФКТ не использовался для изучения изменения медленной внутримолекулярной подвижности актина при денатурации. Сведения о способности амилоидных фибрилл белков к ФКТ в литературе отсутствуют.

Задачей настоящей работы явилось изучение ФКТ амилоидных фибрилл инсулина и α -лактальбумина, а также инактивированного актина и использование этого метода для регистрации образования инактивированного актина при денатурации актина GdnHCl.

Материал и методика

Препараты. Актин из скелетных мышц кролика был получен с использованием процедуры полимеризации—деполимеризации (Pardee, Spudich, 1982). Растворы актина в G-буфере (0.2 мМ АТФ, 0.1 мМ CaCl_2 , 0.4 мМ β -меркаптоэтанол и 5 мМ Трис-HCl, pH 8.2) хранили на льду и использовали в течение 1 нед. Кроме того, использовали препараты α -лактальбумина коровы и инсулина фирмы Sigma (США) без дополнительной очистки. При исследовании характеристик ФКТ использовали растворы белков с концентрацией 0.8—2.5 мг/мл. Нативность препаратов актина и α -лактальбумина характеризовали с помощью параметра $A = (I_{320}/I_{365})_{297}$, где I_{320} и I_{365} — интенсивности флуоресценции при длинах волн регистра-

ции 320 и 365 нм соответственно и возбуждения 297 нм (Turoverov, 1976). Использовали препараты актина с параметром A не ниже 2.56, что соответствует содержанию инактивированного актина не более 2 % (Turoverov et al., 1976).

Для получения амилоидных фибрилл инсулина и коровьего α -лактальбумина готовили растворы этих белков (2—10 мг/мл) в 20%-ной уксусной кислоте и 0.1 н. HCl соответственно (рН 2.0) в присутствии 100 мМ NaCl (Goers et al., 2002). Растворы инкубировали в стеклянных флаконах при 37 °С и интенсивном перемешивании. Образование амилоидных фибрилл контролировали по флуоресценции тиофлавина Т (LeVine, 1999; Воропай и др., 2003). Для этого к 390 мкл раствора тиофлавина Т (1.0 мкМ) в 20 мМ Трис-HCl, рН 7.7, в присутствии 150 мМ NaCl добавляли 10 мкл фибрилл. Флуоресценцию тиофлавина Т возбуждали при длине волны 435 нм, регистрировали при 475 нм.

Инактивацию актина проводили путем смешивания белка в буферном растворе с раствором GdnHCl в необходимых пропорциях, с тем чтобы конечные концентрации белка составляли от 0.8 до 2.5 мг/мл, а концентрации GdnHCl от 0.5 до 1.8 М. Концентрацию GdnHCl в растворах контролировали по показателю преломления с помощью рефрактометра Abbe (ЛОМО, Россия). Удаление кислорода из растворов белка осуществляли с помощью сульфита натрия в конечной концентрации 50 мМ (Gonnelli, Strambini, 1993; Мажуль и др., 1999). Время инкубации с сульфитом натрия, предшествующее началу измерений, составляло 7 мин. Остаточная концентрация кислорода в образцах не превышала 1 нМ. Все измерения проведены при 20 °С.

Кинетику затухания ФКТ исследуемых образцов регистрировали при 20 °С с помощью автоматизированного высокочувствительного устройства с монохроматорами в каналах возбуждения и регистрации (Mazhul', Shcherbin, 1997; Мажуль, Щербин, 1998). Время разрешения фосфороскопа составляло 1 мс. Возбуждение фосфоресценции проводили при длине волны 297 нм. Регистрацию кинетики затухания фосфоресценции осуществляли при длине волны 445 нм. С помощью входящего в состав устройства персонального компьютера проводили накопление результатов измерений и анализ кинетических параметров фосфоресценции. ФКТ актина измеряли в кварцевой кювете с длиной оптического пути 2 мм.

Кинетику затухания ФКТ актина анализировали в двухэкспоненциальном приближении по методу наименьших квадратов с помощью программы Fotobio, разработанной Отделом системного анализа Белорусского государственного университета (Минск):

$$I(t)/I_0 = \alpha_1 \exp(-t/\tau_1) + \alpha_2 \exp(-t/\tau_2), \quad (1)$$

где $I(t)$ — интенсивность фосфоресценции, I_0 — интенсивность фосфоресценции в начальный момент времени, τ_1 — время жизни быстрой компоненты, τ_2 — время жизни медленной компоненты, α_1 и α_2 — амплитуды соответственно быстрой и медленной компонент ($\alpha_1 + \alpha_2 = 1$).

Для оценки адекватности выбранной модели экспериментальным данным использовали критерий χ^2 , а также характер временной зависимости средневзвешенных остатков (разности между измеренными значениями функции затухания и ее восстановленными значениями) и автокорреляционной функции остатков.

Интегральную интенсивность фосфоресценции ($I_{\text{инт}}$) рассчитывали как площадь под кривой кинетики затухания по формуле

$$\begin{aligned} I_{\text{инт}} &= I_0 \left(\alpha_1 \int_0^{\infty} \exp(-t/\tau_1) dt + \alpha_2 \int_0^{\infty} \exp(-t/\tau_2) dt \right) = \\ &= I_0 (\alpha_1 \tau_1 + \alpha_2 \tau_2) = I_0 \bar{\tau}. \end{aligned} \quad (2)$$

Здесь $\bar{\tau}$ — среднее время затухания ФКТ. Вклад в излучение быстрой компоненты S_1 определяется соотношением

$$\begin{aligned} S_1 &= \frac{\alpha_1 \int_0^{\infty} \exp(-t/\tau_1) dt}{\alpha_1 \int_0^{\infty} \exp(-t/\tau_1) dt + \alpha_2 \int_0^{\infty} \exp(-t/\tau_2) dt} = \\ &= \frac{\alpha_1 \tau_1}{\alpha_1 \tau_1 + \alpha_2 \tau_2}. \end{aligned} \quad (3)$$

Средневзвешенное время жизни фосфоресценции $\langle \tau \rangle$ рассчитывали на основании соотношения

$$\langle \tau \rangle = \frac{\alpha_1 \tau_1^2 + \alpha_2 \tau_2^2}{\alpha_1 \tau_1 + \alpha_2 \tau_2}. \quad (4)$$

Все представленные результаты являются средними значениями пяти независимых экспериментов и более.

Результаты

Зарегистрированные нами спектры ФКТ нативного G- и F-актина и инактивированного актина имеют максимумы при длинах волн 417, 445 и 470 нм соответственно и не различаются между собой по форме (рис. 1).

На рис. 2 представлена кинетика затухания ФКТ нативного и инактивированного актина. Кинетика затухания триптофановой ФКТ G-, F- и инактивированного актина удовлетворительно описывается суммой двух экспонент. Значения различных параметров ФКТ (τ_1 , τ_2 , $\langle \tau \rangle$, α_1 , S_1) для G-, F- и инактивированного актина приведены в табл. 1. Следует обратить внимание на хорошее совпадение значений времен жизни быстрой и медленной компонент ФКТ и их вкладов для G- и F-актина с данными, полученными Страбини и Лерером (Strambini, Lehrer, 1991). При полимеризации актина быстрая компонента триптофановой ФКТ не изменяется, а значение медленной компоненты и ее вклад в суммарную фосфоресценцию увеличиваются (табл. 1). Оказалось, что для инактивированного актина время жизни ФКТ существенно больше, чем для нативного актина, вне зависимости от способа инактивации. При этом увеличиваются как τ_1 , так и τ_2 . Кроме того, изменяются вклады этих компонент в суммарную фосфоресценцию. В отличие от G- и F-актина в инактивированном актине больший вклад в фосфоресценцию дает медленная компонента.

На рис. 3 представлены кинетические зависимости $\langle \tau \rangle$ и $I_{\text{инт}}$ ФКТ растворов актина различной концентрации при инкубации в 1.8 М GdnHCl. В наших экспериментах начало фосфоресцентных измерений лимитиро-

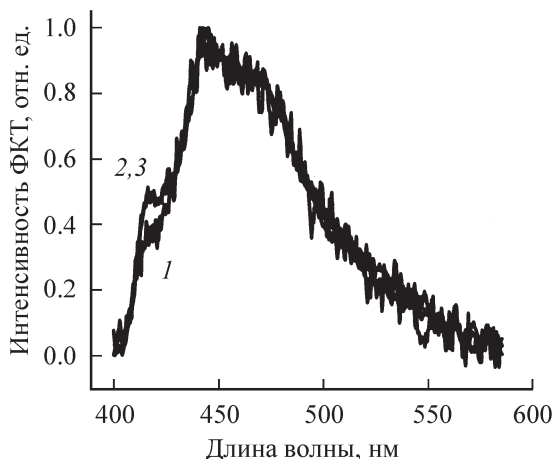


Рис. 1. Спектры фосфоресценции актина при комнатной температуре.

1—3 — спектры G-, F- и инактивированного актина соответственно. Инактивированный актин был получен путем инкубации G-актина в растворе 1.8 М GdnHCl в течение 24 ч. Все спектры приведены к единице в максимуме при 445 нм. Концентрация белка 1.5 мг/мл, $\lambda_{\text{возб.}} = 297$ нм.

валось «мертвым временем», необходимым для удаления из раствора тушителя фосфоресценции — кислорода, которое составляло приблизительно 7 мин. Было установлено, что при концентрации белка 0.8 мг/мл в 1-ю мин после начала измерений ФКТ актина не регистрируется. Затем появлялась слабая по интенсивности ФКТ. При дальнейшей инкубации актина в растворе GdnHCl значения $\langle \tau \rangle$ и $I_{\text{инт.}}$ ФКТ увеличивались во времени и достигали максимума приблизительно через 70 мин (рис. 3). При увеличении концентрации актина до 1.0—2.5 мг/мл ФКТ регистрировалась сразу же после окончания процедуры удаления кислорода из раствора, т. е. через 7 мин после начала инкубации с GdnHCl, и максимальный уровень значений $\langle \tau \rangle$ и $I_{\text{инт.}}$ достигался значительно быстрее. После достижения максимальных значений величины $\langle \tau \rangle$ и $I_{\text{инт.}}$ ФКТ актина сохраняли постоянство. Оказалось, что максимальные значения $\langle \tau \rangle$ ФКТ не зависят, а вели-

Таблица 1
Характеристики фосфоресценции при комнатной температуре G-, F- и инактивированного актина

Актин	τ_1 , мс	τ_2 , мс	$\langle \tau \rangle$, мс	α_1	S_1
G	13	200	57.7	0.98	0.76
F	13	230	89.7	0.97	0.65
I (удаление Ca ²⁺)	71	403	303	0.71	0.30
I (70 °С, 30 мин)	75	440	352	0.65	0.24
I (1.5 М GdnHCl, 20 ч)	66	400	304	0.71	0.26
I (диализ из 6 М GdnHCl, 20 ч)	72	420	331	0.67	0.26
I (4 М мочевины, 24 ч)	65	390	311	0.66	0.25

Примечание. I — инактивированный актин. Времена жизни (τ_1 , τ_2) и предэкспоненциальные множители были определены в биэкспоненциальном приближении. Вклады (S_1) и средние времена жизни фосфоресценции ($\langle \tau \rangle$) были определены на основе соотношений (3) и (4) соответственно.

чины $I_{\text{инт.}}$ зависят от концентрации актина, инкубируемого в 1.8 М GdnHCl.

Оказалось, что время достижения максимальных значений $\langle \tau \rangle$ и $I_{\text{инт.}}$ ФКТ существенно зависит от концентрации GdnHCl. На рис. 4 представлены зависимости $\langle \tau \rangle$ и $I_{\text{инт.}}$ ФКТ актина одинаковой концентрации (1 мг/мл) при инкубации в растворах GdnHCl различной концентрации. При малых концентрациях GdnHCl максимальная величина $\langle \tau \rangle$ не достигается даже при инкубации в течение 24 ч.

На рис. 5 представлены стационарные зависимости характеристик ФКТ актина от содержания GdnHCl в растворе, полученные для нативного и предварительно инактивированного актина. Оказалось, что в области концентраций GdnHCl от 0.8 до 4.0 М величины $\langle \tau \rangle$, α_1 и $I_{\text{инт.}}$ ФКТ растворов исходно нативного и исходно инактивированного актина совпадают. При концентрации GdnHCl от 0 до 0.8 М значения всех характеристик ФКТ для рас-

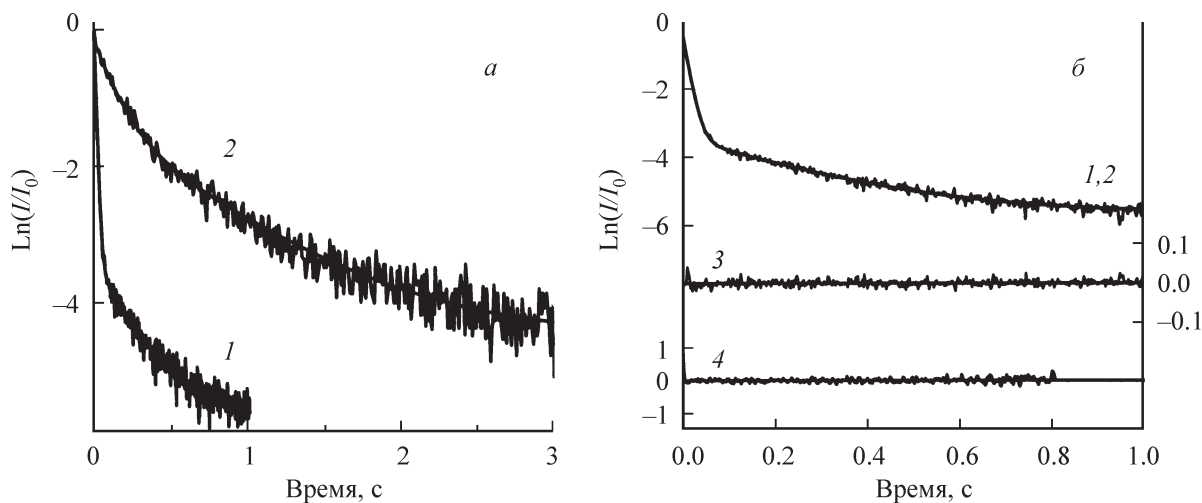


Рис. 2. Кривые затухания фосфоресценции актина.

a — затухание ФКТ нативного актина (1) и актина, инактивированного в 1.5 М GdnHCl (2); I — интенсивность фосфоресценции, I_0 — интенсивность фосфоресценции в начальный момент времени. б — экспериментальная (1) и расчетная (2) кривые ФКТ для нативного актина; 3 — средневзвешенные отклонения, 4 — автокорреляционная функция. Концентрация белка 1.5 мг/мл, $\lambda_{\text{возб.}} = 297$ нм, $\lambda_{\text{рег.}} = 445$ нм.

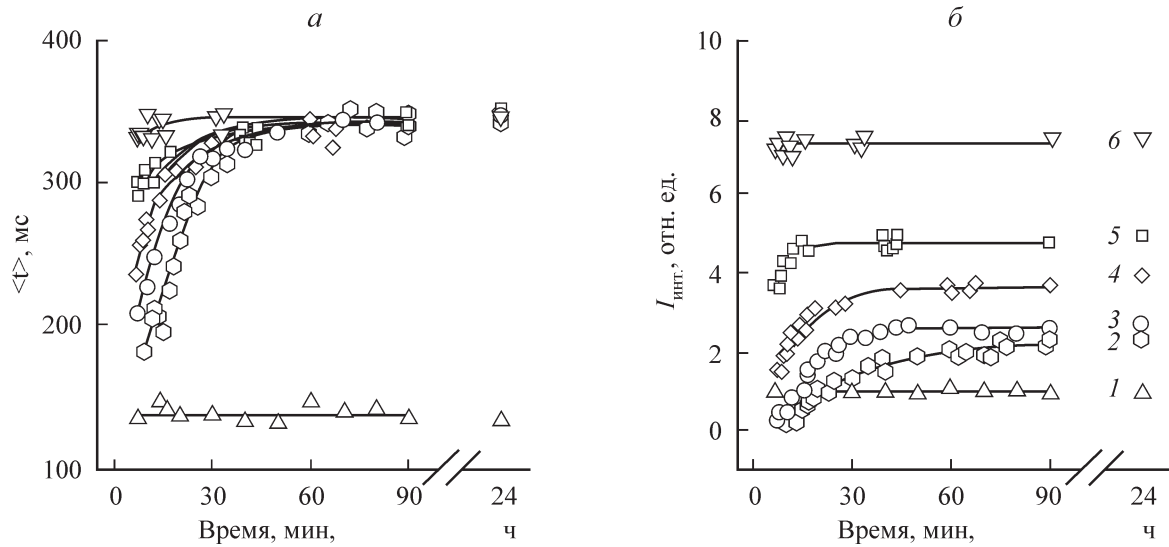


Рис. 3. Кинетика денатурации актина различной концентрации 1.8 М гуанидингидрохлоридом.

a — среднее время жизни ($\langle\tau\rangle$) триптофановой ФКТ; *b* — интегральная интенсивность ($I_{\text{инт.}}$) триптофановой ФКТ. Кривые 2–6 — концентрации актина на 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 мг/мл соответственно; кривая 1 — нативный актин (0 М GdnHCl), концентрация 1.0 мг/мл. $\lambda_{\text{возб.}} = 297$ нм, $\lambda_{\text{рег.}} = 445$ нм.

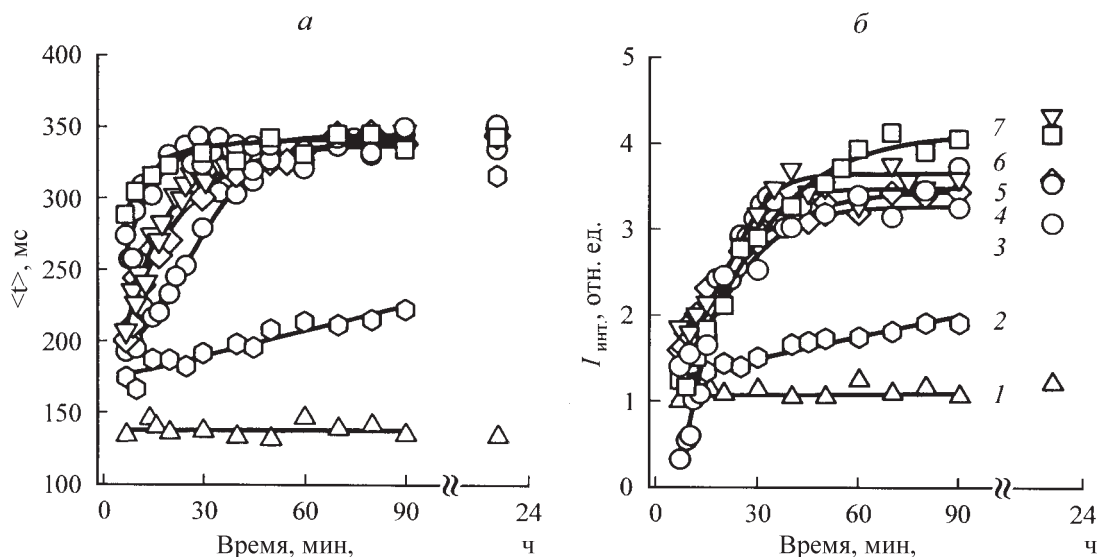


Рис. 4. Кинетика денатурации актина GdnHCl различной концентрации.

a — изменение среднего времени жизни триптофановой ФКТ; *b* — изменение интегральной интенсивности триптофановой ФКТ. 1–7 — конечные концентрации GdnHCl 0, 0.5, 0.7, 1.0, 1.2, 1.5 и 1.8 М соответственно, концентрация актина 1.0 мг/мл. $\lambda_{\text{возб.}} = 297$ нм, $\lambda_{\text{рег.}} = 445$ нм.

Т а б л и ц а 2

Характеристики флуоресценции при комнатной температуре белков в состоянии амилоидных фибрилл

Образец	τ_1 , мс	τ_2 , мс	α_1
α -Лактальбумин ^а	—	—	—
Фибриллы α -лактальбумина	80	510	0.55
Инсулин ^а	—	—	—
Фибриллы инсулина	185	1100	0.55

^а α -Лактальбумин и инсулин в нативном состоянии не флуоресцируют при комнатной температуре.

творов исходно нативного и исходно инактивированного актина существенно различаются. В этой области концентраций денатуранта кривая для растворов исходно нативного актина является квазистационарной, так как при малых концентрациях GdnHCl величины ФКТ актина не достигают максимальных значений даже через 24 ч инкубации. При концентрациях GdnHCl больше 3 М интенсивность ФКТ растворов исходно нативного актина становится настолько низкой, что измерения оказываются невозможными. В то же время для растворов исходно инактивированного актина возможность измерения характеристик ФКТ сохраняется даже после инкубации в течение 24 ч в 4 М GdnHCl.

Измерена кинетика затухания триптофановой ФКТ α -лактальбумина в нативном состоянии и в состоянии

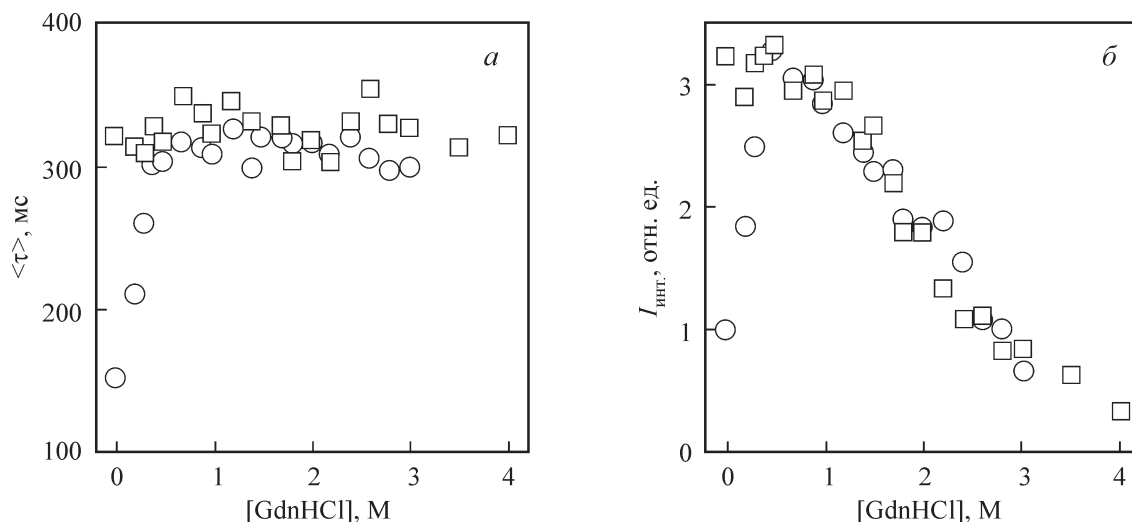


Рис. 5. Зависимость триптофановой ФКТ от концентрации GdnHCl для исходного нативного (кружки) и исходного инактивированного (квадраты) актина.
a — среднее время жизни ($\langle \tau \rangle$) триптофановой ФКТ; *b* — интегральная интенсивность ($I_{\text{инт.}}$) триптофановой ФКТ. Концентрация белка 1.5 мг/мл. $\lambda_{\text{возб.}} = 297$ нм, $\lambda_{\text{рег.}} = 445$ нм.

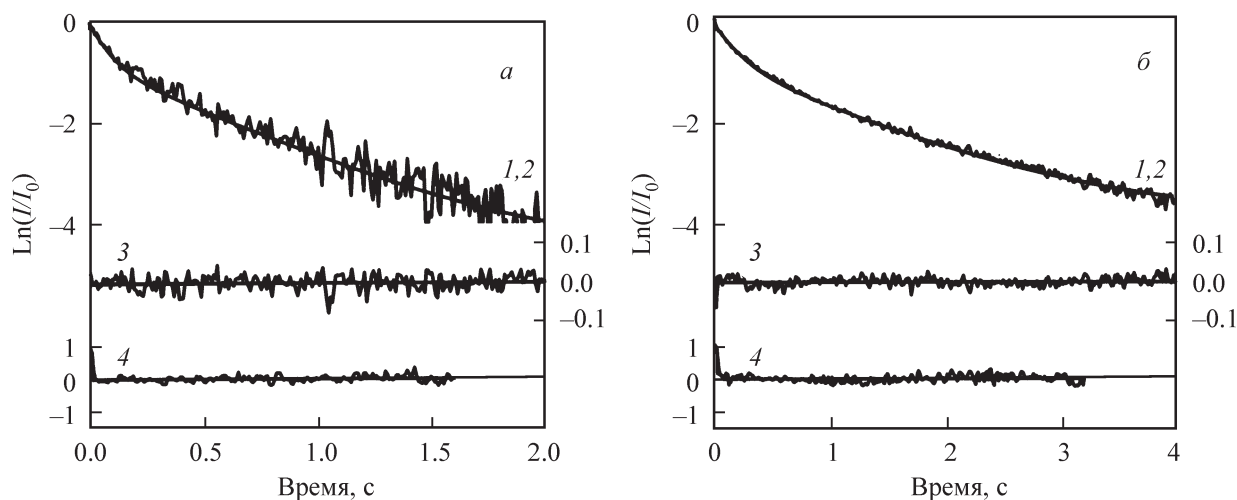


Рис. 6. Кинетика затухания ФКТ α -лактальбуминовых (*a*) и инсулиновых (*b*) фибрилл.
1, 2 — экспериментальная кривая и ее аппроксимация суммой двух экспонент; *I* — интенсивность фосфоресценции, I_0 — интенсивность фосфоресценции в начальный момент времени; *3* — средневзвешенные отклонения, *4* — автокорреляционная функция.

амилоидных фибрилл (рис. 6), а также тирозиновая ФКТ инсулиновых фибрилл. Характеристики ФКТ α -лактальбумина и инсулина в состоянии амилоидных фибрилл приведены в табл. 2.

Обсуждение

Принято считать, что заселение триплетного состояния осуществляется за счет процесса интеркомбинационной конверсии ($S^* \rightarrow T$) из синглетного состояния (Vanderkooi, 1992). Однако следует учитывать также возможность заселения триплетного состояния за счет рекомбинации катион-радикала возбужденного индольного кольца с сольватированным электроном (Fischer et al., 2002). Очевидно, что квантовый выход (q_p), а значит, и интегральная интенсивность фосфоресценции зависят

сложным образом от различных фотофизических процессов, происходящих как в триплетном, так и в синглетном состояниях. В том случае, когда заселение триплетного состояния обусловлено только интеркомбинационной конверсией, время затухания фосфоресценции определяется только процессами излучательной и безызлучательной дезактивации этого состояния.

В бескислородной среде основным механизмом тушения триптофановой фосфоресценции является дезактивация возбужденных триплетных состояний в результате соударений индольного кольца триптофанового остатка с окружающими его элементами структуры макромолекулы. Частота и энергия таких бимолекулярных столкновений, приводящих к непланарной деформации индольного кольца и безызлучательной релаксации триплетных состояний, определяют эффективность динамического тушения триптофановой фосфоресценции.

При локализации триптофановых остатков в жестких внутренних участках глобулы с высокой плотностью упаковки микроокружения значения τ ФКТ составляют от 1—2 с до сотен миллисекунд. В таком окружении, близком по жесткости к состоянию кристалла, находится, например, остаток Trp-109 щелочной фосфатазы *Escherichia coli* ($\tau \approx 2$ с). Значения τ ФКТ остатков, локализованных в более подвижном окружении, сокращаются до десятков миллисекунд, а в некоторых случаях даже до 1.0—0.5 мс. Возбужденные триплетные состояния триптофановых остатков, расположенных на периферии глобулы в высокоподвижном окружении, дезактивируются в основном безызлучательным путем, что проявляется в эффективном динамическом тушении ФКТ, приводящем к значительному уменьшению времени затухания (Strambini, 1989; Vanderkooi, 1992; Gonnelli, Strambini, 1993, 1995; Subramaniam et al., 1996; Shauerte et al., 1997; Sun et al., 1998; Мажуль и др., 1999, 2000; Fisher et al., 2000).

Существенное влияние на характеристики триптофановой фосфоресценции может оказывать локализация в непосредственной близости от индольного кольца триптофанового остатка боковых радикалов некоторых аминокислот — тушителей фосфоресценции. По способности тушить триптофановую фосфоресценцию боковые цепи аминокислотных остатков можно разделить на три класса: 1) сильнотушащие ($k_q \approx 5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), к которым относятся остатки цистеина и цистина; 2) умереннотушащие ($k_q \approx 5 \cdot 10^5$ — $2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) — остатки тирозина, гистидина и триптофана; 3) слаботушащие и нетушащие ($k_q \leq 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), включающие в себя все остальные остатки аминокислот (Gonnelli, Strambini, 1995). Тушение ФКТ боковыми группами цистеина, цистина, тирозина и триптофана возможно, если расстояние между индольным кольцом и тушащей группой соизмеримо с величиной Ван-дер-Ваальсового радиуса (не превышает нескольких ангстрем).

Особая роль в эффектах внутримолекулярного тушения принадлежит дисульфидным группам. Их выраженная способность к тушению ФКТ объясняется способностью акцептировать электрон от триптофана в возбужденном триплетном состоянии (Li et al., 1989, 1992; Shauerte et al., 1997). Внутримолекулярное тушение может осуществляться не только при перманентном контакте индольного кольца с боковой группой остатка аминокислоты (статическое тушение), но и в моменты их относительно кратковременных контактов, происходящих в результате флуктуаций структуры белка (Gonnelli, Strambini, 1995). Таким образом, эффективность тушащего действия групп — потенциальных тушителей фосфоресценции, сближенных с индольными кольцами в силу особенностей пространственной структуры макромолекулы, — также в значительной мере определяется внутримолекулярной подвижностью микроокружения хромофоров. Присутствие в составе микроокружения триптофанового остатка групп — потенциальных тушителей ФКТ — не всегда приводит к эффекту тушения фосфоресценции. Эффективность тушения определяется не только расстоянием между остатком триптофана и тушащей группой, но и положением тушащей группы относительно индольного кольца триптофанового остатка. Из-за сложности учета всех факторов, приводящих к дезактивации триплетных возбужденных состояний, определить точно параметры фосфоресценции каждого индивидуального триптофанового остатка в белке удается далеко не всегда.

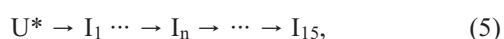
Большинство белков в растворе в бескислородной среде в миллисекундном и секундном диапазонах не фосфоресцирует при комнатной температуре. Это обусловлено прежде всего достаточно высокой эффективностью динамического тушения фосфоресценции хромофоров. Возрастание жесткости структуры не способных к ФКТ белков в результате перевода их из раствора в твердое агрегатное состояние (кристаллы, собственные пленки) во всех случаях приводит к появлению хорошо регистрируемой ФКТ. У способных к ФКТ белков такая процедура сопряжена с увеличением квантового выхода и времени затухания ФКТ в десятки раз. Сходный эффект наблюдается при образовании агрегатов белков (Мажуль и др., 1983, 2000).

Как отмечалось выше, инактивация актина приводит к значительному увеличению времен жизни быстрой и медленной компонент затухания ФКТ. Рост в несколько раз значений τ_1 , τ_2 , $\langle \tau \rangle$ ФКТ актина после его инактивации в результате инкубации с денатурантом в течение 24 ч свидетельствует о существенном снижении внутримолекулярной подвижности белка в местах локализации остатков триптофана, способных к ФКТ. Наиболее вероятной причиной такого возрастания жесткости микроокружения триптофановых остатков является стабилизация структуры актина в инактивированном состоянии в результате ассоциации частично свернутых макромолекул. Инактивированный актин представляет собой термодинамически стабильный монодисперсный ассоциат с константой седиментации 20S, состоящий из 15 мономерных единиц (Kuznetsova et al., 1999b). Рост τ ФКТ ассоциатов белка наблюдался ранее при исследовании гликогенфосфорилазы b из мышц кролика (Мажуль и др., 1999). Данные ФКТ свидетельствуют о том, что внутримолекулярная подвижность инактивированного актина, полученного различными способами, мало различается. О низкой подвижности микроокружения триптофановых остатков в инактивированном актине наносекундного диапазона свидетельствует характер спектров КД в ближней УФ-области спектра (Kuznetsova, 1999a; Turoverov et al., 1999).

Зависимости τ_1 , τ_2 , α_1 и $I_{\text{инт}}$ от концентрации GdnHCl для исходно нативного и исходно инактивированного актина совпадают в области концентрации GdnHCl от 0.8 до 1.8 М (рис. 5, а). При концентрации GdnHCl меньше 0.8 М значения τ_1 , τ_2 и $I_{\text{инт}}$ меньше, а α_1 больше для исходно нативного актина по сравнению с соответствующими значениями для исходно инактивированного белка. Это обусловлено тем, что в этой области концентраций GdnHCl значения всех этих характеристик ФКТ для исходно нативного актина являются квазистационарными и не достигают своих равновесных значений, характерных для инактивированного актина, при инкубации в растворах GdnHCl в течение 24 ч и более. Значения τ_1 , τ_2 для инактивированного актина слабо уменьшаются с ростом концентрации GdnHCl в области от 0 до 1.8 М. За счет перераспределения вкладов быстрой и медленной компонент средние значения времен затухания фосфоресценции остаются постоянными в этой области концентраций GdnHCl. В то же время интегральная интенсивность фосфоресценции существенно уменьшается с ростом концентрации GdnHCl от 0 до 1.8 М (рис. 5, б). Это уменьшение настолько значительно, что на его фоне не регистрируется четко изменение $I_{\text{инт}}$, обусловленное превращением инактивированного актина в полностью развернутое состояние, происходящее в области концентраций GdnHCl от 1.8 до 3.5 М.

В настоящее время трудно однозначно объяснить, почему время затухания фосфоресценции для инактивированного актина практически не зависит от концентрации GdnHCl в растворе в пределах от 0 до 4.0 М, в то время как $I_{\text{инт.}}$ существенно уменьшается с ростом концентраций GdnHCl. $I_{\text{инт.}}$ ФКТ полностью развернутого актина равна нулю, поэтому в области концентраций GdnHCl, отвечающих переходу инактивированного актина в полностью развернутое состояние (1.8—3.5 М GdnHCl), $I_{\text{инт.}}$ ФКТ уменьшается по мере уменьшения доли инактивированного актина, а время затухания ФКТ остается неизменным и равным времени затухания ФКТ инактивированного актина. Известно, что разворачивание исходно инактивированного актина при его переходе в раствор 4 М GdnHCl осуществляется медленно (Kuznetsova, 2002), так что даже через 1 сут после начала инкубации в 4 М GdnHCl в растворе сохраняется некоторое количество инактивированного актина. Вот почему для исходно инактивированного актина зависимость $I_{\text{инт.}}$ от концентрации GdnHCl удается измерять вплоть до 4 М GdnHCl. Времена жизни триптофановой ФКТ растворов исходно инактивированного актина в 4 М GdnHCl после инкубации в течение 24 ч, как и следовало ожидать, сохраняют значения, характерные для инактивированного актина.

Результаты исследования кинетики изменения $I_{\text{инт.}}$ ФКТ при переводе актина в 1.8 М GdnHCl, выполненные при относительно низкой концентрации белка (0.8 мг/мл), подтвердили вывод о том, что образованию инактивированного актина предшествует существенное разворачивание макромолекулы белка. Эти эксперименты свидетельствуют также о том, что в этом состоянии (U^*) $I_{\text{инт.}}$ ФКТ равна нулю. Слабую ФКТ удается зарегистрировать в этих условиях лишь через несколько минут после начала фосфоресцентных измерений (до этого еще 7 мин требуется для удаления кислорода). При дальнейшей инкубации в растворе 1.8 М GdnHCl интегральная интенсивность ФКТ постепенно возрастала и через 70 мин достигала максимального значения, по величине близкого к интенсивности ФКТ инактивированного актина. Таким образом, возрастание интенсивности ФКТ отражает процесс образования инактивированного актина из существенно развернутого состояния U^* . Если бы это превращение являлось процессом «все или ничего», то интенсивная характеристика системы, такая как $\langle \tau \rangle$, должна была бы быть равной величине соответствующей характеристике для инактивированного актина во всем диапазоне изменения $I_{\text{инт.}}$ от нуля до максимального значения. Это, однако, не так. Значение этой характеристики возрастает симбатно с возрастанием $I_{\text{инт.}}$. Причина этого вполне объяснима. Инактивированный актин, представляющий собой гомогенный ассоциат, состоящий из 15 макромолекул актина, не может образовываться из существенно развернутого состояния актина в результате одностадийного перехода из U^* в I. Инактивированный актин образуется из состояния U^* путем постепенного наращивания массы ассоциата:



сопровождающегося увеличением его жесткости. Подтверждением справедливости этого достаточно очевидного, но не имеющего до этого экспериментальных доказательств заключения о процессах образования инактивированного актина является существенная зависимость скорости образования инактивированного актина от концентрации белка в растворе.

Как видно на рис. 3, время достижения максимальных значений $I_{\text{инт.}}$ и $\langle \tau \rangle$ ФКТ, отвечающих образованию инактивированного актина, сокращается при росте содержания белка в растворе. Это объясняется увеличением эффективности образования ассоциатов инактивированного актина при возрастании количества белковых макромолекул в растворе. Начиная с концентрации белка 1.5 мг/мл уже через 7 мин после начала инкубации актина в растворе 1.8 М GdnHCl накапливается такое количество инактивированного актина, обладающего жесткой структурой, которое позволяет осуществлять надежную регистрацию ФКТ. Судя по достаточно высоким максимальным значениям τ_1 , τ_2 и $\langle \tau \rangle$ ФКТ актина, инкубированного при различных концентрациях (0.8—2.5 мг/мл) в растворе 1.8 М GdnHCl, медленная внутримолекулярная подвижность инактивированного актина резко снижена по сравнению как с существенно развернутым состоянием, так и с нативным состоянием белка (рис. 3, б; табл. 1).

Таким образом, данные, полученные с использованием метода ФКТ, подтвердили предложенную ранее схему процессов сворачивания—разворачивания актина (Kuznetsova et al., 2002), показали, что превращение U^* в I осуществляется путем постепенного наращивания массы образующегося ассоциата, и позволили охарактеризовать медленную внутримолекулярную подвижность актина в различных структурных состояниях.

Показано, что α -лактальбумин обладает очень низкой начальной интенсивностью триптофановой ФКТ (рис. 6, а). Кинетика затухания ФКТ α -лактальбумина биэкспоненциальна с временами жизни $\tau_1 = 40$ мс и $\tau_2 = 250$ мс (рис. 6, б; табл. 2). Тирозиновая ФКТ инсулина в миллисекундном диапазоне не регистрируется (Trp в инсулине отсутствует). Слабовыраженная способность к ФКТ у α -лактальбумина и отсутствие ФКТ у инсулина объясняются сильным тушением фосфоресценции вследствие выраженной внутримолекулярной динамики с миллисекундными характерными временами в областях локализации хромофоров. После перевода α -лактальбумина в состояние амилоидных фибрилл его способность к триптофановой ФКТ резко усиливалась. При этом τ_1 и τ_2 ФКТ возрастали до значений 70 и 480 мс соответственно (рис. 6, б; табл. 2). У инсулина в состоянии амилоидных фибрилл появлялась способность к тирозиновой ФКТ со значениями τ_1 и τ_2 65 и 275 мс соответственно (табл. 2). Результаты проведенного фосфоресцентного анализа свидетельствуют о том, что перевод белков в состояние амилоидных фибрилл сопряжено с выраженным снижением медленных внутримолекулярных движений, т. е. с возрастанием жесткости структуры белка.

Таким образом, на примере актина, инсулина и α -лактальбумина показано, что метод ФКТ, используемый для изучения внутримолекулярной подвижности в белках, может давать существенную информацию о процессах образования аморфных агрегатов и амилоидных фибрилл.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проекты Б02Р-077 и Б04-102), Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-49622), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и INTAS (грант 01-2347).

Список литературы

- Воропай Е. С., Самцов М. П., Каплевский К. Н., Маскельвич А. А., Степура В. И., Поварова О. И., Кузнецова И. М., Туроверов К. К., Финк А. Л., Уверский В. Н. 2003. Спектральные свойства тиофлавина Т и его комплексов с амилоидными фибриллами. Журн. прикл. спектроскопии. 70 (6) : 767—773.
- Мажуль В. М., Зайцева Е. М., Мицкевич Л. Г., Федуркина Н. В., Курганов Б. И. 1999. Фосфоресцентный анализ внутримолекулярной динамики мышечной гликогенфосфорилазы б. Биофизика. 44 (6) : 1010—1016.
- Мажуль В. М., Зайцева Е. М., Щербин Д. Г. 2000. Внутримолекулярная динамика и функциональная активность белков. Биофизика. 45 (6) : 965—989.
- Мажуль В. М., Конев С. В., Ермолаев Ю. С., Мартынова М. А., Никольская В. П., Проколова Ж. В. 1983. Исследование равновесной динамики структуры белков методом триптофановой фосфоресценции при комнатной температуре. Биофизика. 28 (6) : 980—983.
- Мажуль В. М., Щербин Д. Г. 1998. Низкотемпературная фосфоресценция продуктов перекисного окисления липидов. Биофизика. 43 (3) : 456—462.
- Bertazzon A., Tian G. H., Lamblin A., Tsong T. Y. 1990. Enthalpic and entropic contributions to actin stability: calorimetry, circular dichroism and fluorescence study and effect of calcium. Biochemistry. 29 : 291—298.
- Carrell R. W., Gooptu B. 1998. Conformational changes and disease-serpins, prions and Alzheimer's. Curr. Opin. Struct. Biol. 8 : 799—809.
- Contaxis C. C., Bigelow C. C., Zarkadas C. G. 1977. The terminal denaturation of bovine cardiac G-actin. Can. J. Biochem. 55 : 325—331.
- Fink A. L. 1998. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. Fold. Des. 3 : 9—23.
- Fischer C. J., Gafni A., Steel D. G., Schauerte J. A. 2002. The triplet-state lifetime of indole in aqueous and viscous environments: significance to the interpretation of room temperature phosphorescence in proteins. J. Amer. Chem. Soc. 124 : 10 359—10 366.
- Fischer C. J., Schauerte J. A., Wissner K. C., Gafni A., Steel D. G. 2000. Hydrogen exchange at the core of *Escherichia coli* alkaline phosphatase studied by room-temperature tryptophan phosphorescence. Biochemistry. 39 : 1455—1461.
- Goers J., Permyakov S. E., Permyakov E. A., Uversky V. N., Fink A. L. 2002. Conformational prerequisites for α -lactalbumin fibrillation. Biochemistry. 41 : 12 546—12 551.
- Gonnelli M., Strambini G. B. 1993. Glycerol effects on protein flexibility: a tryptophan phosphorescence study. Biophys. J. 65 : 131—137.
- Gonnelli M., Strambini G. B. 1995. Phosphorescence lifetime of tryptophan in proteins. Biochemistry. 34 : 13 847—13 857.
- Harper J. D., Lansbury P. T., Jr. 1997. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. Ann. Rev. Biochem. 66 : 385—407.
- Hashimoto M., Masliah E. 1999. Alpha-synuclein in Lewy body disease and Alzheimer's disease. Brain Pathol. 9 : 707—720.
- Herrmann H., Aebi U. 1998. Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions. Curr. Opin. Struct. Biol. 8 : 177—185.
- Horie T., Vanderkooij J. M. 1982. Phosphorescence of tryptophan from parvalbumin and actin in liquid solution. FEBS Lett. 147 : 69—73.
- Kelly J. W. 1997. Amyloid fibril formation and protein misassembly: a structural quest for insight into amyloid and prion diseases. Structure. 5 : 595—600.
- Koo E. H., Lansbury P. T., Jr., Kelly J. W. 1999. Amyloid disease abnormal protein aggregation in neurodegeneration. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 96 : 9989—9990.
- Kuznetsova I. M., Biktashev A. G., Khaitlina S. Yu., Vassilenko K. S., Turoverov K. K., Uversky V. N. 1999a. Effect of self-association on the structural organization of partially folded proteins: inactivated actin. Biophys. J. 77 : 2788—2800.
- Kuznetsova I. M., Khaitlina S. Yu., Konditerov S. N., Surin A. M., Turoverov K. K. 1988. Changes of structure and intramolecular mobility in the course of actin denaturation. Biophys. Chem. 32 : 73—78.
- Kuznetsova I. M., Stepanenko Olga V., Stepanenko Olesia V., Povarova O. I., Biktashev A. G., Verkhusha V. V., Shavlovsky M. M., Turoverov K. K. 2002. The place of inactivated actin and its kinetic predecessor in actin folding—unfolding. Biochemistry. 41 : 13 127—13 132.
- Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Uversky V. N. 1999b. Unusual combination of the distorted structure and frozen internal mobility in inactivated actin molecule. Protein Peptide Lett. 6 : 73—78.
- Le Bihan T., Gicquaud C. 1993. Kinetic study of the thermal denaturation of G-actin using differential scanning calorimetry and intrinsic fluorescence spectroscopy. Biochem. Biophys. Res. Commun. 194 : 1065—1073.
- Lehrer S. L., Kerwar G. 1972. Intrinsic fluorescence of actin. Biochemistry. 11 : 1211—1217.
- Le Vine H. III. 1999. Quantification of β -sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. Meth. Enzymol. 309 : 277—284.
- Li Z., Bruce A., Galley W. C. 1992. Temperature dependence of the disulfide perturbation to the triplet state of tryptophan. Biophys. J. 61 : 1364—1371.
- Li Z., Lee W. E., Galley W. C. 1989. Distance dependence of the tryptophan-disulfide interaction at the triplet level from pulsed phosphorescence studies on a model system. Biophys. J. 56 : 361—367.
- Mazhul' V. M., Shcherbin D. G. 1997. Tryptophan phosphorescence as a monitor of flexibility of membrane proteins in cells. Proc. SPIE. 2980 : 507—514.
- Nagy B., Jencks W. P. 1962. Optical rotatory dispersion of G-actin. Biochemistry. 1 : 987—996.
- Nagy B., Strzelecka-Golaszewska H. 1972. Optical rotatory dispersion and circular dichroic spectra of G-actin. Arch. Biochem. Biophys. 150 : 428—435.
- Pardee J. D., Spudich J. A. 1982. Purification of muscle actin. Meth. Enzymol. 85 : 164—181.
- Schauerte J. A., Steel D. G., Gafni A. 1997. Time-resolved room temperature tryptophan phosphorescence in proteins. Meth. Enzymol. 278 : 49—71.
- Schuler H., Lindberg U., Schutt C. E., Karlsson R. 2000. Thermal unfolding of G-actin monitored with the DNase I-inhibition assay. Stabilities of actin isoforms. Eur. J. Biochem. 267 : 476—486.
- Strambini G. B. 1989. Tryptophan phosphorescence as a monitor of protein flexibility. J. Mol. Liq. 42 : 155—163.
- Strambini G. B., Lehrer S. S. 1991. Tryptophan phosphorescence of G-actin and F-actin. Eur. J. Biochem. 195 : 645—651.
- Strzelecka-Golaszewska H., Nagy B., Gergely J. 1974. Changes in conformation and nucleotide binding of Ca, Mn or Mg G-actin upon removal of the bound divalent ion. Studies of ultraviolet difference spectra and optical rotation. Arch. Biochem. Biophys. 161 : 559—569.
- Subramaniam V., Gafni A., Steel D. G. 1996. Time-resolved tryptophan phosphorescence spectroscopy: a sensitive probe of protein folding and structure IEEE. J. Selected Topics in Quantum Electronics. 2 : 1107—1114.
- Sun L., Kantrowitz E. R., Galley W. C. 1998. Recent advances in protein room-temperature phosphorescence spectroscopy. Proc. SPIE. 3256 : 236—242.
- Turoverov K. K., Biktashev A. G., Khaitlina S. Yu., Kuznetsova I. M. 1999. The structure and dynamics of partially folded actin. Biochemistry. 38 : 6261—6269.
- Turoverov K. K., Khaitlina S. Yu., Pinaev G. P. 1976. Ultra-violet fluorescence of actin. Determination of native actin content in actin preparations. FEBS Lett. 62 : 4—7.
- Turoverov K. K., Verkhusha V. V., Shavlovsky M. M., Biktashev A. G., Povarova O. I., Kuznetsova I. M. 2002. Kinetics of actin unfolding induced by guanidine hydrochloride. Biochemistry. 41 : 1041—1019.
- Uversky V. N., Talapatra A., Gillespie J. R., Fink A. L. 1999a. Protein deposits as the molecular basis of amyloidoses. I. Systematic amyloidoses. Med. Sci. Monitor. 5 : 1001—1012.

Uversky V. N., Talapatra A., Gillespie J. R., Fink A. L. 1999b. Protein deposits as the molecular basis of amyloidoses. II. Localized amyloidoses and neurodegenerative disorders. *Med. Sci. Monitor.* 5 : 1238—1254.

Vanderkooi J. M. 1992. Tryptophan phosphorescence from proteins at room temperature. In: *Topics in fluorescence spectroscopy*. New York: Plenum Press. 3 : 113—136.

Wetzel R. 1994. Mutations and off-pathway aggregation of proteins. *Trends Biotechnol.* 12 : 193—198.

Поступила 16 V 2005

ROOM TEMPERATURE PHOSPHORESCENCE OF AMORPHOUS AGGREGATES AND AMYLOID FIBRILS RESULTING FROM PROTEIN MISFOLDING

V. M. Mazhul,¹ E. M. Zaitseva,¹ M. M. Shavlovsky,² O. I. Povarova,³
I. M. Kuznetsova,³ K. K. Turoverov^{3,*}

¹ Institute of Biophysics and Cell Engineering, NASB, Minsk, Belarus, ² Institute for Experimental Medicine, RAMS, and ³ Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg, Russia;
* e-mail: kkt@mail.cytspb.rssi.ru

Using actin, α -lactalbumin and insulin as examples, it was shown that the formation of amorphous aggregates of proteins and amyloid fibrils leads to an increase in the rigidity of tryptophan and tyrosine residues micro-environment and, consequently, to the appearance of tryptophan (tyrosine) room temperature phosphorescence (RTP). RTP was used for examining a slow intramolecular mobility of native (G-, F-form) and inactivated (I) rabbit skeletal muscle actin during the process of GdnHCl induced protein unfolding. This method made it possible to confirm that an essentially unfolded intermediate precedes the formation of inactivated actin. It has been found that the kinetic intermediate generated at the early stage of protein denaturation has no tryptophan RTP, suggesting a high lability of its structure. Symbate changes of integral intensity (relative quantum yield) and the mean lifetime of RTP during the $U^* \rightarrow I$ transition suggest a gradual increase of the number of monomers incorporated in the associate ($U^* \rightarrow I_{1...} \rightarrow I_{n...} \rightarrow I_{15}$), which is accompanied by an increase of protein structural rigidity. The rate of inactivated actin formation ($I \rightarrow I_{15}$) is shown to increase with the increase of protein concentration. It is shown that, no matter what method of inactivation was employed (1—2 M GdnHCl or 3.0—3.5 M urea, Ca^{2+} removal, incubation at 70 °C, refolding from completely unfolded state by dialysis from 8 M urea or 6 M GdnHCl), actin transition to the inactivated state is accompanied by a significant increase in both integral intensity and the mean lifetime of RTP, suggesting the rigid structure of inactivated actin. It is shown that the lifetime of inactivated actin RTP does not depend on GdnHCl concentration within the limits from 0 to 4 M. On using insulin and α -lactalbumin as examples, it is shown that RTP can be used in studies of fibrillogenesis and properties of amyloid fibrils.

Key words: room temperature phosphorescence, amyloid fibrils, actin, protein folding, α -lactalbumin, insulin.