

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АКТИНА
В РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРНЫХ СОСТОЯНИЯХ.
НОВЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПРОЦЕССАХ ЕГО СВОРАЧИВАНИЯ—РАЗВОРАЧИВАНИЯ**

© *О. И. Поварова, И. М. Кузнецова, К. К. Туроверов*

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: kkt@mail.cytspb.rssi.ru*

В работе обобщены результаты изучения процессов сворачивания—разворачивания актина и свойств возникающих при этом промежуточных и неправильно свернутых состояний. Дан подробный анализ свойств микроокружения и особенностей локализации триптофановых остатков актина, позволивший сделать вывод о том, что основной вклад во флуоресценцию нативного актина вносят внутренние, локализованные в гидрофобных областях триптофановые остатки Trp 340 и Trp 356, в то время как триптофановые остатки Trp 79 и Trp 86 затушены. Показано, что инактивированный актин, который до этого рассматривался как промежуточное состояние между нативной и полностью развернутой конформациями белка, на самом деле представляет собой неправильно свернутое агрегированное состояние. Подробно проанализированы свойства актина в этом состоянии. В частности, показано, что инактивированный актин является монодисперсным ассоциатом, состоящим из 15 мономерных единиц. Обнаружены и охарактеризованы два ранее неизвестных промежуточных состояния, предшествующих полному разворачиванию макромолекулы белка и образованию инактивированного актина. Предложена принципиально новая схема процессов сворачивания—разворачивания актина. Показано, что причиной ряда аномальных явлений, имеющих место в растворах актина, содержащих малые концентрации GdnHCl, является специфическое взаимодействие актина с денатурантом.

Ключевые слова: актин, фолдинг белков, промежуточные состояния, кинетика денатурации, собственная флуоресценция белков, инактивированный актин.

Принятые сокращения: АНС — 1-анилинафталин-8-сульфонат, КД — круговой дихроизм, GdnHCl — гуанидингидрохлорид, I — инактивированный актин, N — нативный актин, U — полностью развернутое состояние актина, U* — существенно развернутый кинетический интермедиат актина.

Выявление и характеристика свойств промежуточных частично свернутых и неправильно свернутых состояний, возникающих в процессе сворачивания—разворачивания белков, являются основным подходом при проведении исследований, направленных на установление механизмов сворачивания полипептидной цепи в уникальную структуру, обеспечивающую выполнение белком его биологической функции. Стабилизация структуры неправильно свернутых состояний, возникающих в процессе сворачивания—разворачивания белков, часто осуществляется за счет их ассоциации и агрегации. При этом могут возникать как неупорядоченные аморфные агрегаты, так и упорядоченные структуры — амилоидные фибриллы (De Young et al., 1993; Fink, 1995a, 1998; Kelly, 2000). Изучение структуры и путей образования денатурированных частично свернутых агрегированных (ассоциированных) форм белков важны для решения фундаментальной проблемы фолдинга белка. Кроме того, такие исследования имеют практическое значение для медицины в связи с существованием заболеваний, связанных с нарушением фолдинга белков (так называемые конформационные болезни) (Harper, Lansbury, 1997; Kelly, 1997; Carrell, Gooptu, 1998; Fink, 1998;

Hashimoto, Masliah, 1999; Koo et al., 1999; Uversky et al., 1999), а также для биотехнологии в связи с необходимостью анализа причин возникновения неправильно свернутых агрегированных форм рекомбинантных белков и их аккумуляции в телах включения (Frankel et al., 1990; Speed et al., 1996).

Большинство исследований по изучению фолдинга белков выполнено на небольших однодоменных белках, для которых процесс разворачивания является обратимым. Актуальным является изучение путей сворачивания более сложных мультидоменных белков, а также возникающих при этом промежуточных и неправильно свернутых агрегированных форм белков. В настоящей работе обобщены результаты изучения процессов сворачивания—разворачивания актина, представляющего собой чрезвычайно интересную модель для такого рода исследований. Поскольку значительная часть этих исследований выполнена с использованием метода собственной УФ-флуоресценции, в работе также проведен подробный анализ свойств микроокружения и особенностей локализации триптофановых остатков, ответственных за собственную флуоресценцию актина.

Собственная флуоресценция нативного актина. Микроокружение триптофановых остатков

Актин — один из основных белков системы мышечного сокращения и цитоскелета эукариотических клеток (Sheterline et al., 1998; Pollard et al., 2000). Глобула G-актина сформирована одной полипептидной цепью, состоящей из 375 аминокислотных остатков. При низкой ионной силе актин является мономером (G-актин), в присутствии нейтральных солей он полимеризуется с образованием двухнитевой спирали (фибриллярный, или F-актин). F-актин является основным компонентом тонких филаментов мышечной ткани. Трехмерная структура была определена для актина в комплексе с белками, предотвращающими его полимеризацию, — ДНКазой I (Kabsch et al., 1990), гельзолином (McLaughlin et al., 1993; Robinson et al., 1999) и профилином (Schutt et al., 1993), а также для АДФ-актина, модифицированного тетраметилродамин-5-малеимидом (Otterbein et al., 2001). По данным рентгеноструктурного анализа комплекса G-актина с ДНКазой I, молекула актина состоит из двух доменов, ее общий размер составляет $5.5 \times 5.5 \times 3.5$ нм (рис. 1). Как N-, так и C-конец полипептидной цепи находятся в малом домене. Каждый домен состоит из двух субдоменов. Малый домен в свою очередь состоит из субдомена I (остатки 1—32, 70—144

и 338—372) и субдомена II (остатки 33—69), а большой домен — из субдомена III (остатки 145—180 и 270—337) и субдомена IV (остатки 181—269). Элементами структуры малого домена являются пять β -складчатых структур, окруженных пятью α -спиралями (в субдомene I), и три антипараллельных β -складчатых листа с α -спиралью, соединяющей концы двух β -листов (в субдомene II). В субдомene III большого домена имеется пять β -складчатых структур, окруженных тремя α -спиралями, в субдомene IV — два антипараллельных β -слоя и четыре α -спирали. Домены разделены глубокой щелью. В щели между доменами расположены одна молекула АТФ (или АДФ) и прочно связанный двухвалентный катион Mg^{2+} (рис. 1). In vitro Mg^{2+} обычно замещен на Ca^{2+} .

В нативном состоянии актин имеет относительно коротковолновый спектр флуоресценции (рис. 2) с максимумом при длине волны 325 нм (Turoverov et al., 1976). Лишь немногие из изученных триптофансодержащих белков, например азурин *Pseudomonas aeruginosa* (Finazzi-Argo et al., 1970), РНКазы Т1 (Yamamoto, Tanaka, 1970), РНКазы С2 (Agekyan et al., 1988) и парвальбумин мерланга (Permyakov et al., 1980), имеют более коротковолновый спектр флуоресценции.

Как известно, положение и форма спектра флуоресценции белка определяются наложением спектров флуоресценции отдельных триптофановых остатков — их по-

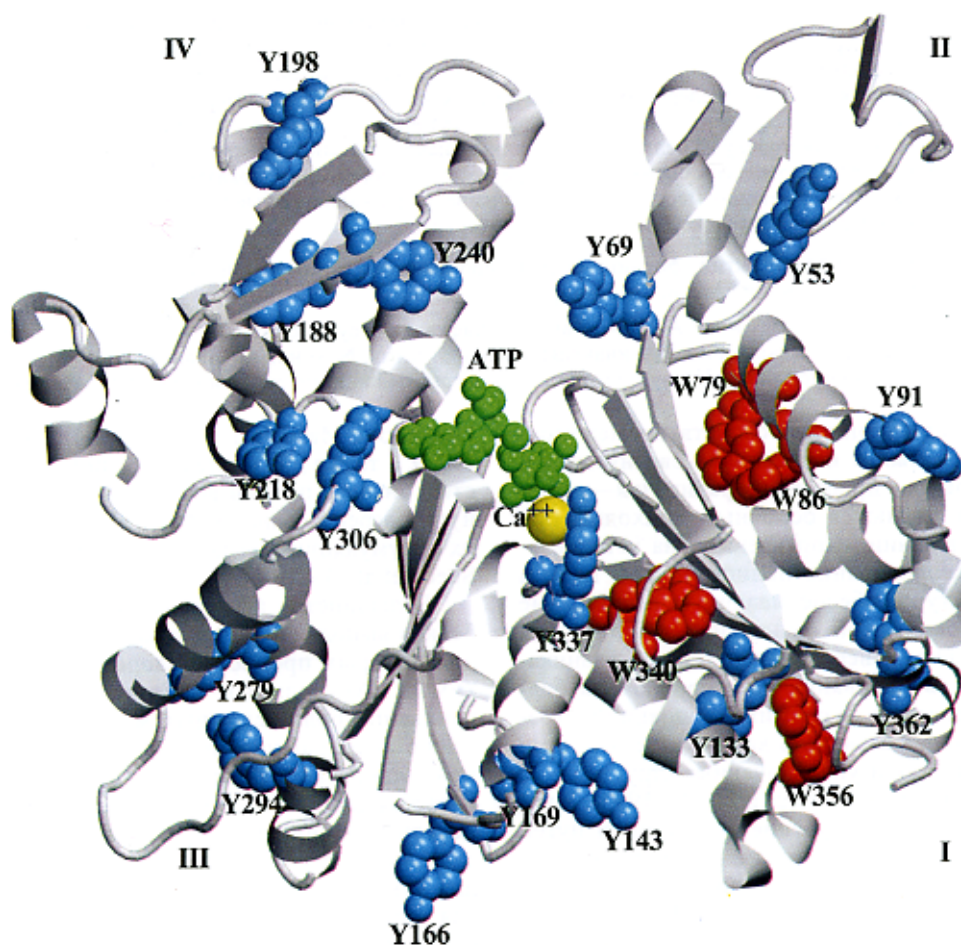


Рис. 1. Пространственная структура молекулы актина.

Показаны триптофановые остатки (красным), тирозиновые остатки (синим), катион Ca^{2+} (желтым) и молекула АТФ (зеленым). Римские цифры — субдомены актина. Рис. 1, 4 и 5 построены на основе данных Protein Data Bank (Bernstein et al., 1977), файл 1ATN.ent (Kabsch et al., 1990). При подготовке рисунка использовали графические программы VMD (Humphrey et al., 1996) и Raster 3D (Merritt, Bacon, 1977).

ложением в шкале длин волн и относительным вкладом в суммарное свечение. Актин содержит четыре триптофановых остатка, которые расположены в субдомене I. Триптофановые остатки Trp 79, Trp 86 и Trp 340 входят в состав α -спиралей, образованных остатками Trp 79—Asn 92 и Ser 338—Ser 348. Триптофановый остаток Trp 356 расположен в неструктурированной области между α -спиральными участками, образованными остатками Ser 350—Met 355 и Lys 359—Ala 365.

Положение спектров флуоресценции отдельных триптофановых остатков зависит от полярности их микроокружения и его способности релаксировать за время жизни флуоресценции триптофанового остатка. Необходимо учитывать, что полярность микроокружения триптофанового остатка определяется не только его доступностью для молекул растворителя, но и собственными полярными группами белка, входящими в состав микроокружения. Коротковолновый спектр белка может появляться в двух случаях: если триптофановый остаток расположен в гидрофобном микроокружении (вне зависимости от релаксационных свойств последнего) либо за счет жесткости микроокружения, если даже оно полярное. В последнем случае излучение происходит из неравновесного состояния, не отвечающего минимуму энергии взаимодействия со средой.

Анализ микроокружения триптофановых остатков актина был выполнен с использованием данных о пространственной структуре актина в комплексе с ДНКазой I (файл Pdb 1atn.ent в Protein Data Bank; Bernstein et al., 1977; Kabsch et al., 1990). При этом нами было сделано предположение о том, что пространственные структуры свободного актина и актина в комплексе с ДНКазой I совпадают. За микроокружение триптофановых остатков была принята совокупность всех атомов, удаленных от геометрического центра индольного кольца на расстоянии r , меньше некоторого заданного значения r_0 . Для того чтобы при анализе наверняка учесть все атомы, контактирующие с индольным кольцом, величина r_0 была выбрана равной 7 Å (Turoverov et al., 1985; Кузнецова, Туроверов, 1998). Анализ микроокружения каждого триптофанового остатка позволил выявить все группы боковых цепей белка, которые могут влиять на их флуоресцентные свойства (табл. 1).

Одним из параметров микроокружения, существенным для анализа флуоресцентных свойств, является плотность упаковки входящих в его состав атомов. Мера плотности упаковки атомов микроокружения определяется как число атомов, входящих в его состав, или отношение объема, занимаемого атомами микроокружения, к общему объему сферы с радиусом 7 Å:

$$d = \Sigma V_i / V_0. \quad (1)$$

Объем каждого атома определялся на основании известных Ван-дер-Ваальсовых радиусов, при этом учитывалась лишь та часть объема, которая попадала в сферу с радиусом 7 Å. Конечно, такое рассмотрение не совсем точно, так как атомы образуют друг с другом химические связи и, следовательно, занимают меньший объем. Тем не менее для сравнительной оценки плотности упаковки микроокружения разных триптофановых остатков данное обстоятельство не является существенным.

Обычно принимается, что флуоресцентные характеристики триптофановых остатков зависят от их доступности для растворителя. Доступность триптофановых

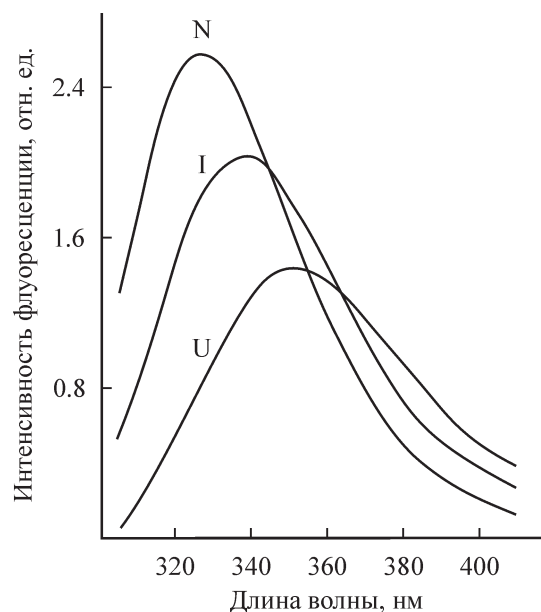


Рис. 2. Спектры флуоресценции нативного (N), инактивированного (I), и полностью развернутого (U) актина. $\lambda_{\text{возб.}} = 297$ нм.

остатков для молекул растворителя зависит не только от плотности упаковки микроокружения триптофанового остатка, но также от его локализации в макромолекуле белка. Доступность триптофанового остатка зависит от того, расположен он в центре макромолекулы белка или на ее периферии. Для оценки доступности триптофанового остатка для молекул растворителя рассчитывали радиальную зависимость плотности упаковки атомов вокруг геометрического центра триптофанового остатка:

$$d(r) = \frac{\Sigma V_i(r, r + \Delta r)}{V_0(r, r + \Delta r)}, \quad (2)$$

где $V_0(r, r + \Delta r)$ — объем шарового слоя сферы, находящегося на расстоянии r от геометрического центра индольного кольца, Δr — толщина слоя, V_i — часть объема i -того атома, входящего в шаровой слой.

Анализ трехмерной структуры актина показал, что плотность упаковки микроокружения отдельных триптофановых остатков различается значительно. Действительно, в сфере радиуса 7 Å с центром, совпадающим с геометрическим центром индольного кольца, содержится 50, 61, 78 и 69 атомов белка для триптофановых остатков Trp 79, Trp 86, Trp 340 и Trp 356 соответственно (табл. 2). Для сравнения отметим, что микроокружение внутреннего триптофанового остатка азурина (Turoverov et al., 1985), имеющего уникально коротковолновый спектр флуоресценции с $\lambda_{\text{max}} = 308$ нм (Finazzi-Argo et al., 1970), содержит 71 атом. Таким образом, триптофановые остатки актина Trp 340 и Trp 356 имеют микроокружение очень высокой плотности ($d = 0.84$ и 0.76). И хотя эти остатки расположены не в центре белковой молекулы, а ближе к ее периферии, о чем свидетельствует резкое уменьшение величины d с увеличением r (рис. 3), они, по-видимому, недоступны для молекул растворителя.

Отличительной особенностью микроокружения Trp 340 и Trp 356 является наличие ароматических колец ти-

Таблица 1

Ближайшие к индольному кольцу атомы микроооружения триптофановых остатков актина

Остаток	Атом	Ближайший атом индольного кольца	Расстояние между атомами, Å	Остаток	Атом	Ближайший атом индольного кольца	Расстояние между атомами, Å
Trp 79				Trp 86			
Ile 122	CD1	CE3	3.58	Asn 12	OD1	NE1	2.92
Asn 115	O	CH2	3.63	Met 123	CE	CD2	3.35
Asn 115	CG	CZ2	3.73	Asn 12	CG	NE1	3.77
Ile 76	CG2	Cntr	3.76	Met 82	CG	CH2	3.84
Ile 76	CD1	CZ3	3.76	Met 82	CE	NE1	3.85
Lys 118	CG	Cntr	3.78	Met 119	CB	CH2	3.87
Asn 115	ND2	CZ2	3.81	Glu 83	CA	CE3	3.92
Met 119	N	CZ3	3.81	Phe 127	CE2	CE3	3.95
Lys 118	CB	CH2	3.9	Asn 12	ND2	NE1	3.99
Asn 115	CB	CH2	3.92	Cys 10	SG	NE1	4.04
Ile 76	CB	CH2	3.93	Ile 122	CG2	CZ3	4.12
Met 119	CB	CZ3	3.94	Glu 83	N	CE3	4.15
Asn 115	CF	CH2	3.97	Ile 76	CD1	CH2	4.19
Met 119	CF	CZ3	4.06	Met 82	C	CE3	4.19
Ile 76	O	CZ2	4.09	Ile 85	C	CG	4.28
Asn 115	OD1	CZ2	4.12	His 87	N	CG	4.48
Asn 78	C	CG	4.13	Thr 89	OG1	CD1	4.48
Asn 115	C	CH2	4.21	Met 82	SD	CZ2	4.85
Lys 118	NZ	CG	4.55	Met 119	SD	CH2	5.15
Met 119	SD	CH2	4.91	Met 123	SD	CE3	5.08
Trp 340				Trp 356			
Val 9	O	NE1	2.81	Gln 353	O	CD1	3.29
Lys 18	O	CD1	3.36	Met 132	O	CE3	3.4
Ala 26	C	CZ3	3.48	Phe 352	CE2	CE2	3.42
Phe 21	O	CH2	3.49	Gln 353	CA	CD1	3.51
Gly 20	CA	CZ2	3.57	Phe 352	CD2	NE1	3.53
Ala 19	CA	NE1	3.58	Met 132	C	CE3	3.57
Ala 26	O	CZ3	3.59	Phe 352	O	CD1	3.67
Val 9	CB	NE1	3.63	Thr 103	O	CZ3	3.68
Val 9	CG1	NE1	3.63	Thr 103	C	CZ3	3.75
Val 9	C	NE1	3.64	Met 132	CA	CE3	3.78
Gly 20	C	CZ2	3.66	Gln 353	C	CD1	3.82
Lys 18	C	CD1	3.67	Tyr 133	CB	CE3	3.87
Ala 19	N	NE1	3.71	Thr 103	N	CZ3	3.9
Ala 19	C	NE1	3.71	Pro 102	CB	CH2	3.91
Pro 27A	N	CE3	3.71	Leu 104	N	CZ3	3.92
Pro 27A	CD	CE3	3.73	Met 132	N	CE3	3.93
Ile 341	N	CE3	3.73	Ala 7	CB	CZ2	4.1
Gly 20	N	CZ2	3.74	Tyr 133	N	CZ3	4.12
Ser 344	OG	CZ3	3.95	Asp 3	OD2	NE1	5.42
Asp 24	OD2	CH2	4.59	Asp 3	OD1	NE1	5.56

Примечание. Полужирным шрифтом выделены полярные группы боковых цепей.

Таблица 2

Характеристики микроокружения триптофановых остатков и конформации их боковых цепей в актине

Трипто- фановый остаток	Конформация боковой цепи Тгр-остатка и плотность упаковки атомов его микроокружения				Ароматические кольца и остатки Pro в микроокруже- нии Тгр-остатка		<i>n</i>	Пептидные связи, входящие в микроокружение Тгр-остатков аминокислотные остатки, образующие связь
	<i>N</i>	<i>d</i>	χ_1	χ_2	остаток	<i>R</i>		
Тгр 79	50	0.60	295	95	Тгр 86	6.4—10.6	4	Ile 76—Thr 77; Thr 77—Asn 78; Asn 78—Trp 79; Trp 79—Asn 80
Тгр 86	61	0.70	282	325	Тгр 79	6.7—8.9	4	Met 82—Gly 83; Gly 83—Lys 84; Ile 85—Trp 86; Trp 86—His 87
					Phe 90	6.2—8.0		
					Phe 127	5.1—7.5		
Тгр 340	78	0.84	190	89	Phe 21	8.5—9.4	11	Val 9—Cys 10; Lys 18—Ala 19; Ala 19—Gly 20; Gly 20—Phe 21; Phe 21—Ala 22; Asp 25—Ala 26; Ala 26—Pro 27; Pro 27—Arg 28; Val 339—Trp 340; Trp 340—Ile 341; Ile 341—Gly 342
					Pro 27	3.9—4.8		
					Tyr 337	6.8—9.4		
Тгр 356	69	0.76	282	15	Pro 102	4.1—6.2	6	Pro 102—Thr 103; Thr 103—Leu 104; Ala 131—Met 132; Met 132—Tyr 133; Met 355—Trp 356; Trp 356—Ile 357
					Pro 130	8.0—9.2		
					Tyr 133	5.8—9.0		
					Phe 352	3.5—6.0		

Примечание. *N* — число атомов, входящих в состав микроокружения; *d* — плотность упаковки атомов микроокружения; χ_1 и χ_2 — углы (град), характеризующие конформацию боковой цепи триптофанового остатка; *n* — число пептидных связей, входящих в микроокружение триптофановых остатков.

розинового и фенилаланинового остатков и колец пролина (табл. 2; рис. 4). Фенольное кольцо Tyr 337 и кольцо Pro 27 находятся в непосредственной близости от остатка Тгр 340, а ароматические кольца Phe 352 и Tyr 133 и кольцо Pro 102 входят в состав микроокружения триптофанового остатка Тгр 356. Аналогичные кластеры ароматических остатков были обнаружены в ряде белков (азурин, рибонуклеаза Т1, L-аспарагиназа), содержащих один триптофановый остаток, имеющих коротковолновый спектр флуоресценции (Кузнецова, Туроверов, 1998). Очень большую плотность микроокружения Тгр 340 можно объяснить наличием пролинового остатка Pro 27, который непосредственно с ним контактирует.

Важно отметить, что остаток Тгр 340 является *t*-конформером ($\chi_1 = 190^\circ$, $\chi_2 = 89^\circ$). Это отличает его от других триптофановых остатков актина (табл. 2) и триптофановых остатков многих других белков (Кузнецова, Туроверов, 1998). Такая же конформация боковой цепи была обнаружена для внутренних триптофановых остатков с очень коротковолновым спектром флуоресценции, таких как Тгр 48 азурина и Тгр 59 рибонуклеазы Т1, и для триптофановых остатков, доступных для растворителей, таких как Тгр 25 глюкогона и Тгр 19 мелиттина (Кузнецова, Туроверов, 1998). По-видимому, такая конформация боковой цепи является ненапряженной. В то же время микроокружение триптофанового остатка Тгр 340 характеризуется очень высокой плотностью. Плотность упаковки микроокружения триптофанового остатка Тгр 340 даже больше, чем у триптофановых остатков Тгр 48 азурина ($d = 0.75$) и Тгр 59 рибонуклеазы Т1 ($d = 0.80$). Более того, торсионные колебания остатка Тгр 340 ограничены остатком Pro 27, кольцо которого расположено практически параллельно индольному кольцу. Весьма вероятно, что ненапряженная конформация боковой цепи остатка Тгр 340, так же как и наличие аромати-

ческих колец тирозинового, фенилаланинового и пролинового остатков в микроокружении Тгр 340, существенна для формирования коротковолнового спектра флуоресценции актина.

Остаток Тгр 86 имеет меньшую плотность упаковки микроокружения, чем Тгр 340 и Тгр 356 (табл. 2), однако он находится далеко от периферии макромолекулы белка и поэтому также недоступен для молекул растворите-

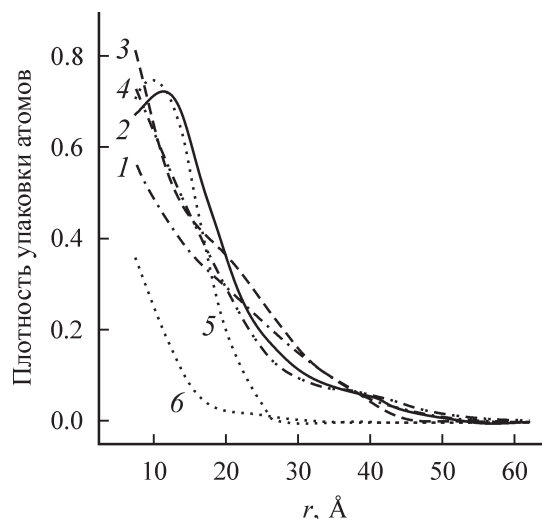


Рис. 3. Радиальная зависимость плотности упаковки атомов макромолекулы актина от геометрических центров индольных колец триптофановых остатков.

Кривые 1—4 — зависимости для остатков Тгр 79, Тгр 86, Тгр 340 и Тгр 356 соответственно. Для сравнения приведены зависимости: 5 — для Тгр 48 азурина (внутреннего остатка) и 6 — Тгр 19 мелиттина (внешнего остатка).

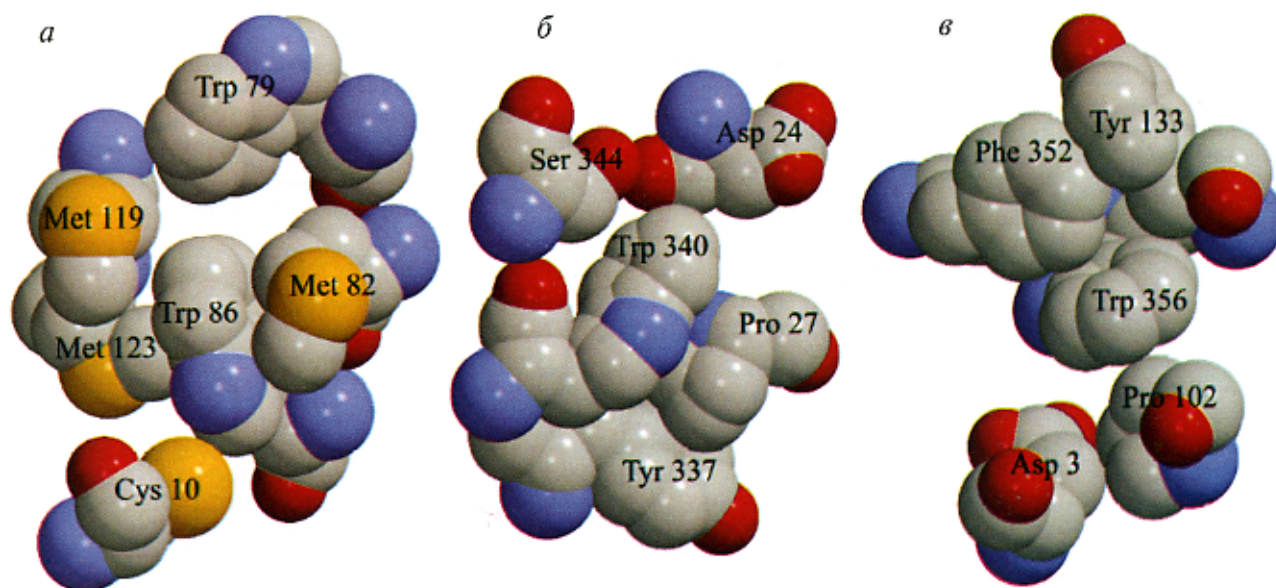


Рис. 4. Особенности микроокружения триптофановых остатков актина.

Атомы серы цистеиновых и метиониновых остатков в составе микроокружения Trp 79 и Trp 86 (а); ароматические остатки и пролин в непосредственной близости к Trp 340 (б) и Trp 356 (в).

ля (рис. 3). Таким образом, единственным доступным для молекул растворителя триптофановым остатком является Trp 79.

Усредненная характеристика доступности триптофановых остатков белка для растворителя была получена в экспериментах по тушению флуоресценции внешним тушителем (Eftink, Ghiron, 1981). Эксперименты показали низкую эффективность тушения триптофановой флуоресценции актина нейтральным тушителем акриламидом (Turoverov et al., 1999b). Низкое значение константы тушения флуоресценции говорит о малой доступности для растворителя триптофановых остатков, ответственных за флуоресценцию, что хорошо согласуется с коротковолновым положением спектра флуоресценции. Таким образом, коротковолновое положение спектра флуоресценции, а также низкую эффективность тушения флуоресценции актина нейтральным тушителем акриламидом можно понять, только если предположить, что более доступный для растворителя и имеющий в своем составе полярные группы остаток Trp 79 не вносит значительного вклада в излучение.

Вклад отдельных триптофановых остатков в собственную флуоресценцию белка определяется квантовым выходом флуоресценции каждого триптофанового остатка, который непосредственно зависит от присутствия вблизи него тушащих групп аминокислотной цепи и от эффективности безызлучательного переноса энергии по индуктивно-резонансному механизму. Конформация боковой цепи триптофанового остатка, полярность его микроокружения и доступность для растворителя также могут влиять на величину квантового выхода.

Карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой аминокислот в протонированной форме, весьма вероятно, являются эффективными тушителями триптофановой флуоресценции и при нейтральных значениях pH не являются таковыми. Ничего не известно о тушащем действии гидроксильных групп серина и треонина. Поэтому, несмотря на то что атомы OD2 остатка Asp 24, OG остатка Ser 344 и OD1 и OD2 остатка Asp 3 входят в состав микроокружения остатков Trp 340 и Trp 356

(табл. 1), маловероятно, что эти атомы влияют на флуоресцентные свойства Trp 340 и Trp 356.

Приведенный анализ микроокружения триптофановых остатков не учитывает наличия большого количества пептидных связей в микроокружении (табл. 2). Интересно, что наибольшее число пептидных связей было обнаружено в микроокружении триптофановых остатков Trp 340 и Trp 356, которые вносят существенный вклад в суммарную флуоресценцию актина. Следовательно, несмотря на то что было показано тушащее действие пептидных групп на флуоресценцию модельных соединений, содержащих индольное кольцо (Chen et al., 1996; Chen, Barkley, 1998), подтверждение того, что пептидные связи влияют на величину квантового выхода и положение спектра флуоресценции триптофановых остатков в белках, еще не получено.

Анализ структуры актина показал, что микроокружение Trp 79 и Trp 86 содержит атомы серы, которые, как известно, являются эффективными внутренними тушителями флуоресценции: атом серы SD метионина Met 119 входит в состав микроокружения Trp 79, в состав микроокружения Trp 86 входят атомы серы SG остатков Met 82, Met 119, Met 123 и SG остатка Cys 10 (табл. 1; рис. 4). Анализ зависимости квантового выхода флуоресценции от специфических свойств микроокружения триптофанового остатка для большого количества белков показал, что эффективность тушения определяется не только наличием тушащих групп вблизи индольного кольца, но и в значительной степени ориентацией этих групп относительно индольного кольца триптофанового остатка (Кузнецова, Туроверов, 1998). Большое число атомов серы вблизи индольного кольца Trp 86 и в особенности непосредственная близость атома серы SG остатка Cys 10 к атому NE1 индольного кольца остатка Trp 86 (табл. 1; рис. 4) позволяют считать этот триптофановый остаток практически полностью затухающим.

Дополнительная информация о вкладе отдельного триптофанового остатка во флуоресценцию актина может быть получена при расчете эффективности безызлу-

чательного переноса энергии между этими триптофановыми остатками. Расстояние между геометрическими центрами индольных колец триптофановых остатков и их взаимная ориентация (рис. 5) были определены исходя из 3-мерной структуры актина. Эффективность переноса определяется соотношением (Forster, 1960)

$$W = \frac{1}{1 + \frac{2/3}{k^2} \left(\frac{R}{R_0} \right)^6}, \quad (3)$$

где R_0 — расстояние между донором и акцептором, при котором для системы молекул донора и акцептора, участвующих в хаотическом броуновском движении, вероятность переноса $W = 0.5$; R — расстояние между геометрическими центрами индольных колец донора и акцептора; k^2 — фактор, учитывающий взаимную ориентацию донора и акцептора:

$$k^2 = (\cos\theta - 3\cos\theta_A\cos\theta_D)^2, \quad (4)$$

где θ — угол между направлениями осцилляторов излучения и поглощения молекул донора и акцептора соответственно, θ_A и θ_D — углы между направлениями указанных осцилляторов и вектором, соединяющим эти молекулы (Dale, Eisinger, 1974). Величина R_0 была взята из литературы, остальные величины определяли на основании координат атомов (Turoverov et al., 1985; Кузнецова, Туроверов, 1998). Расчет проводили в рамках модели неподвижных, строго ориентированных осцилляторов. Вследствие неопределенности величины квантового выхода донора и величины интеграла перекрытия спектров флуоресценции донора и поглощения акцептора значения W для переноса энергии Trp—Trp были рассчитаны при значениях R_0 , равных 7.8 и 8.7 Å (Eisinger et al., 1969; Steinberg, 1971). Была установлена высокая эффек-

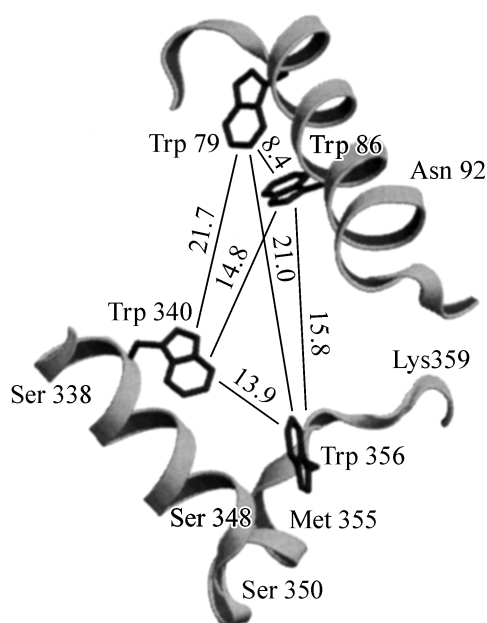


Рис. 5. Локализация триптофановых остатков в молекуле актина.

Расстояние между геометрическими центрами индольных колец триптофановых остатков даны в Å.

Таблица 3

Характеристики безызлучательного переноса энергии между триптофановыми остатками актина

Остаток	Trp 79	Trp 86	Trp 340	Trp 356
Trp 79		0.64—0.77	0.01—0.02	0.01—0.02
Trp 86	1.6		0.11—0.19	0.00—0.01
Trp 340	2.7	3.4		0.05—0.09
Trp 356	2.8	0.1	1.0	

Примечание. В правой верхней части таблицы приведены значения эффективности безызлучательного переноса энергии по индуктивно-резонансному механизму W , рассчитанной для двух значений R_0 (7.8 и 8.7 Å); в левой нижней части — значения фактора k^2 , учитывающего взаимную ориентацию донора и акцептора.

тивность безызлучательного переноса энергии между остатками Trp 79 и Trp 86 (табл. 3). Следовательно, если даже Trp 79 не затушен входящим в его микроокружение атомом серы SD Met 119, он должен иметь низкий квантовый выход вследствие эффективного переноса энергии на триптофановый остаток Trp 86. Перенос энергии между другими парами триптофановых остатков в актине малоэффективен (табл. 3).

Следовательно, собственная УФ-флуоресценция актина в нативном состоянии определяется в основном внутренними малодоступными для растворителя триптофановыми остатками Trp 340 и Trp 356, микроокружение которых имеет высокую плотность упаковки и сформировано в основном неполярными группами белка (табл. 1, 2). В то же время триптофановые остатки Trp 79 и Trp 86, расположенные в полярном микроокружении, затушены и вносят минимальный вклад во флуоресценцию актина. Все заключения о вкладе отдельных триптофановых остатков в общую флуоресценцию актина (Kuznetsova et al., 1999c), сделанные нами на основании анализа пространственной структуры актина, были полностью подтверждены в работе, посвященной сравнительному изучению флуоресцентных свойств мутантных форм дрожжевого актина с аминокислотными заменами по триптофановым остаткам (Doyle et al., 2001).

Инактивированный актин и его свойства

Отщепление катиона кальция приводит к переходу белка в состояние, получившее название инактивированного актина, в котором актин не способен к полимеризации (Кузнецова и др., 1998; Turoverov et al., 1999b). Инактивированный актин может быть получен также из нативного белка в результате тепловой денатурации (Nagy, Jencks, 1962; West et al., 1967; Nagy, Strzelecka-Golaszewska, 1972; Strzelecka-Golaszewska et al., 1974, 1985; Contaxis et al., 1977; Татунашвили, Привалов, 1984; Kuznetsova et al., 1988; Bertazzon et al., 1990; Le Bihan, Gicquaud, 1993; Кузнецова и др., 1998; Turoverov et al., 1999a; Schuler, 2000), под воздействием умеренных концентраций мочевины или GdnHCl (Kuznetsova et al., 1988; Turoverov et al., 1999a), при разведении или диализе из растворов 8 М мочевины или 6 М GdnHCl (Kuznetsova et al., 1988; Bertazzon et al., 1990) и даже спонтанно при длительном хранении препаратов (Kuznetsova et al., 1988). Свойства инактивированного актина не зависят от

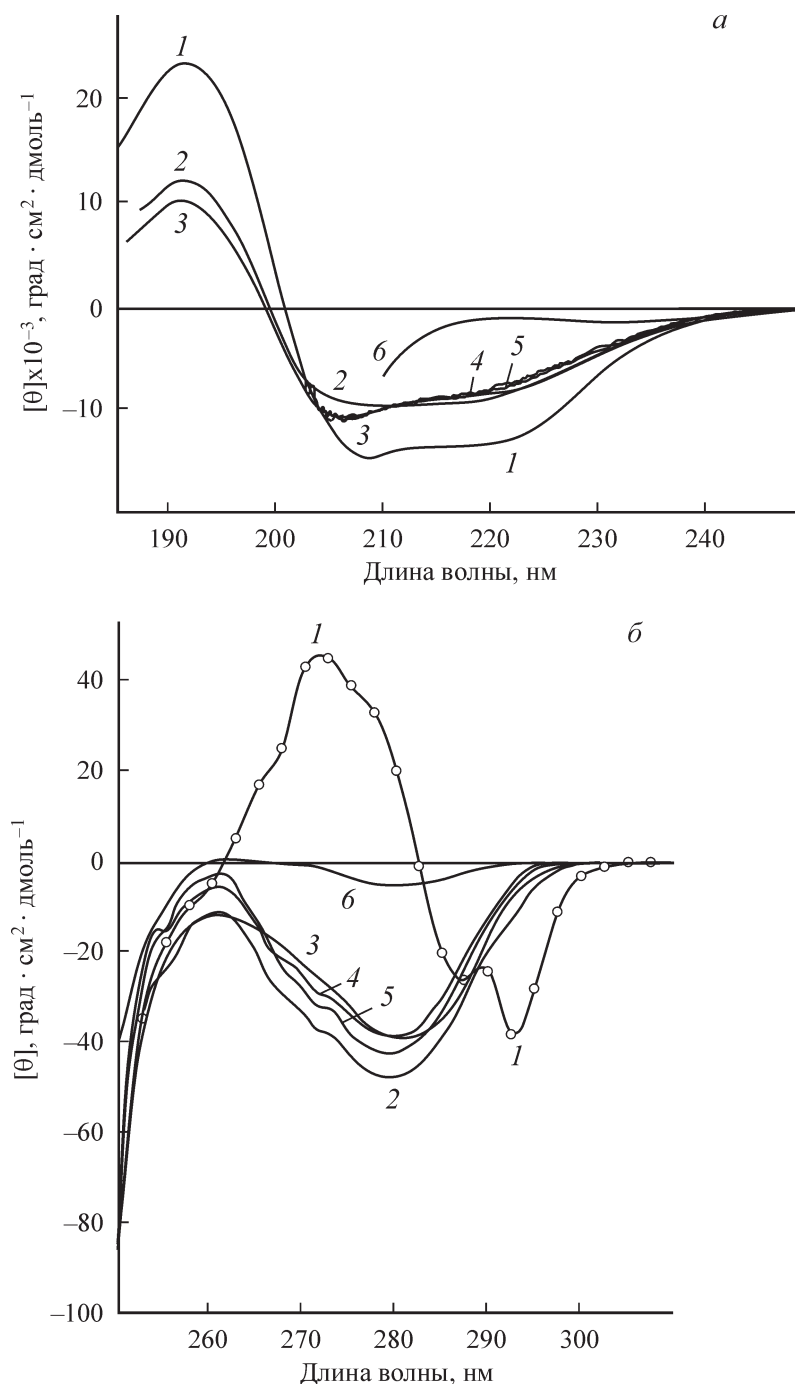


Рис. 6. Спектры кругового дихроизма в дальней (а) и ближней (б) УФ-областях актина в различных структурных состояниях. 1 — нативный актин, 2 — инактивированный актин, полученный путем нагревания, 3 — актин, инактивированный EDTA, 4 — актин в 1.5 M GdnHCl, 5 — актин в 4.0 M мочеvine, 6 — полностью развернутый актин (в растворе 6 M GdnHCl).

способа его получения (Kuznetsova et al., 1988, 1999b; Turoverov et al., 1999a, 1999b). До недавнего времени считали, что инактивированный актин представляет собой термодинамически стабильное промежуточное состояние на пути перехода из нативного в полностью развернутое состояние. Новые представления о роли инактивированного актина в процессах сворачивания—разворачивания актина будут рассмотрены ниже.

Вторичная структура инактивированного актина. Инактивация актина приводит к заметным изменениям КД в дальней УФ-области спектра (рис. 6, а). В то же

время сопоставление КД инактивированного актина, полученного разными путями, свидетельствует о близости их вторичной структуры. Изменение спектра КД в дальней УФ-области спектра свидетельствует о переходе части α -спиралей в неупорядоченное состояние и увеличении относительного вклада β -структур (Nagy, Strzelecka-Golaszewska, 1972; Strzelecka-Golaszewska et al., 1985; Kuznetsova et al., 1988; Bertazzon et al., 1990). Появление дополнительных β -структур при денатурации часто коррелирует с агрегацией белка (Joly, 1965; Strzelecka-Golaszewska et al., 1985).

Диэлектрические и релаксационные свойства микроокружения триптофановых остатков нативного и инактивированного актина. Инактивированный актин по сравнению с нативным имеет значительно более длинноволновое положение спектра флуоресценции ($\lambda_{\text{max}} = 340$ нм, $A = 1.3$; рис. 2). Это свидетельствует о том, что в инактивированном актине ответственные за флуоресценцию триптофановые остатки находятся в полярном и подвижном (релаксирующем за время жизни возбужденного состояния) микроокружении. Спектр флуоресценции инактивированного актина, однако, более коротковолновый по сравнению со спектрами флуоресценции белков в полностью развернутом состоянии (в том числе по сравнению со спектром актина в 8 М мочеvine; $\lambda_{\text{max}} = 350$ нм, $A = 0.4$). В то же время при переходе в инактивированное состояние не происходит значительного изменения квантового выхода флуоресценции (рис. 2). На основании этого можно предположить, что в инактивированном актине остатки Trp 79 и Trp 86, по-видимому, так же как и в случае нативного белка, не вносят существенного вклада в излучение. По-видимому, сохраняются близость этих триптофановых остатков к тушащим группам и высокая эффективность переноса энергии между ними. Такое предположение хорошо согласуется с тем, что в промежуточном состоянии, возможно, в большей степени сохраняется структура гидрофильных участков макромолекулы, в то время как гидрофобные группы становятся доступными для растворителя и образуют кластеры на поверхности макромолекулы (см. ниже). В таком случае длинноволновый сдвиг спектра флуоресценции связан с переходом остатков Trp 340 и Trp 356 из гидрофобного в полярное окружение.

Спектр КД инактивированного актина в ближней УФ-области спектра представляет собой интенсивную широкую отрицательную полосу с минимумом при 280 нм (рис. 6, б). Это означает, что внутримолекулярная подвижность групп, входящих в состав микроокружения ароматических остатков, недостаточна, для того чтобы нивелировать асимметрию их микроокружения. Более того, поскольку спектры КД нативного и инактивированного актина существенно различаются по форме, это означает, что ароматические остатки имеют в этих состояниях асимметричное, но существенно различное окружение.

Обычно длинноволновый сдвиг спектра флуоресценции белков при различных денатурирующих воздействиях связывают с разрушением глобулярной, плотно упакованной структуры и возникновением более «рыхлой», развернутой структуры, в которой ответственные за флуоресценцию триптофановые остатки становятся доступными для полярного растворителя. Результаты изучения тушения флуоресценции инактивированного актина внешним тушителем акриламидом свидетельствует о том, что в случае актина это не так.

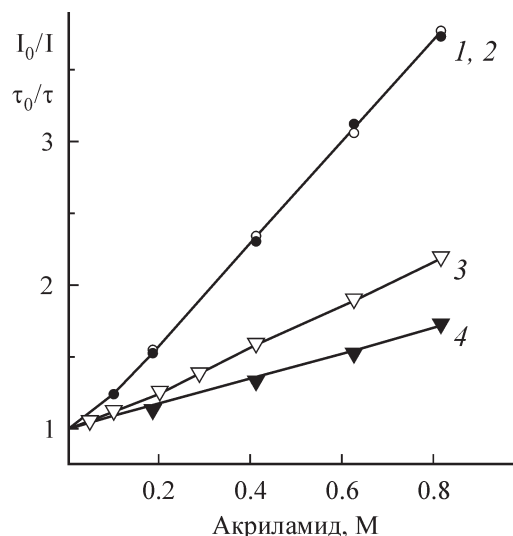


Рис. 7. Тушение флуоресценции нативного (2, 4) и инактивированного (1, 3) актина акриламидом.

Данные представлены в координатах Штерн-Фольмера с использованием результатов измерения интенсивности флуоресценции (1, 2) и времени жизни возбужденного состояния (3, 4).

Локализация триптофановых остатков в инактивированном актине. Экспериментально измеренные зависимости I_0/I от концентрации акриламида ($[Q]$) для нативного и инактивированного актина представляют собой кривые, выгнутые к оси абсцисс (рис. 7). В то же время зависимости τ_0/τ от $[Q]$ во всем экспериментальном интервале изменения концентрации акриламида (до 0.8 М) имеют линейный характер. Это, а также линейный характер зависимости $I_0/I \cdot \exp(V/[Q])$ от концентрации акриламида $[Q]$, где V — константа статического тушения, свидетельствуют о существовании как для нативного, так и для инактивированного актина наряду с динамическим статического тушения. Константы Штерн—Фольмера динамического и статического тушения, а также бимолекулярная константа динамического тушения, определенные с учетом измеренных в настоящей работе времен жизни возбужденного состояния, представлены в табл. 4.

Полученные результаты свидетельствуют о низкой эффективности динамического тушения флуоресценции актина не только в нативном, но и в инактивированном состоянии. Таким образом, триптофановые остатки, ответственные за флуоресценцию инактивированного актина, находятся во внутренних, недоступных для растворителя областях макромолекулы, сформированных полярными группами боковых цепей аминокислот. Красный сдвиг спектра триптофановой флуоресценции очень часто связывают с увеличением доступности триптофановых остатков для молекул растворителя. Именно такое

Таблица 4

Времена жизни и константы тушения флуоресценции актина

Актин	τ_1 , нс	f_1	τ_2 , нс	f_2	$\langle \tau \rangle$, нс	$k_q \cdot 10^9$, М ⁻¹ с ⁻¹	K , М ⁻¹	V , М ⁻¹
Нативный	6.6	0.48	2.46	0.52	4.4	0.43	1.7	0.68
Инактивированный	7.56	0.49	3.33	0.51	5.4	0.16	0.83	1.18

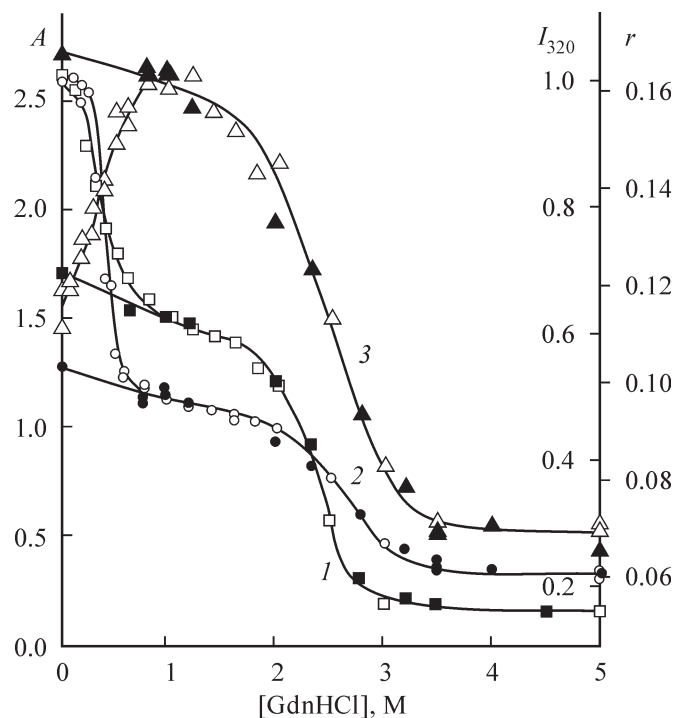


Рис. 8. Изменение параметров собственной флуоресценции актина под действием GdnHCl.

I — интенсивность флуоресценции, зарегистрированная при длине волны 320 нм (I_{320}); 2 — параметр $A = (I_{320} / I_{365})_{297}$; 3 — анизотропия флуоресценции, r ; светлые и темные символы — эксперименты по денатурации и ренатурации соответственно.

объяснение красного сдвига спектра при инактивации актина приводится в литературе (Lehrer, Kerwar, 1972; Bertazzon et al., 1990). На примере актина становится очевидным, что положение спектра триптофановой флуоресценции определяется не только доступностью триптофановых остатков для растворителя, но и полярностью

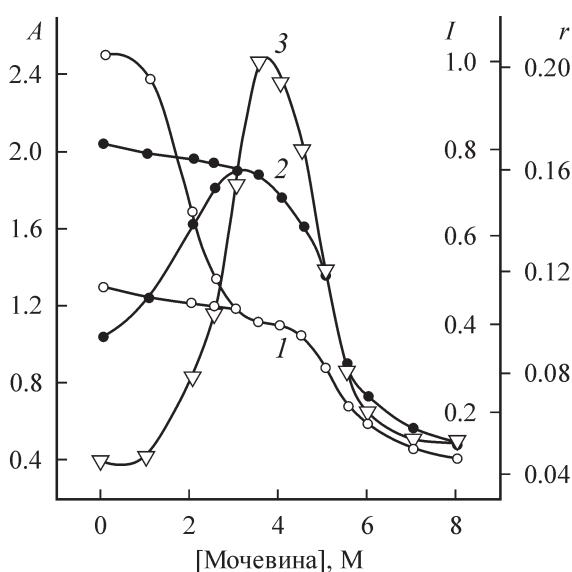


Рис. 9. Изменение параметров собственной флуоресценции актина и флуоресценции АНС под действием мочевины.

I — спектральный параметр A , 2 — анизотропия флуоресценции, 3 — интенсивность флуоресценции АНС.

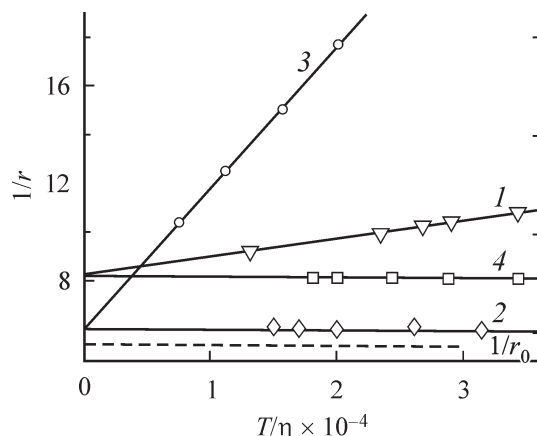


Рис. 10. Зависимости $1/r = f(T/\eta)$ для актина в различных структурных состояниях.

1 — нативный актин, 2 — инактивированный актин, 3 — актин в 8 М мочевины, 4 — F-актин. $\lambda_{\text{возб.}} = 297$ нм, $\lambda_{\text{рег.}} = 365$ нм.

микроокружения, сформированного собственными группами белка.

Гидродинамические характеристики инактивированного актина. Переход нативный—инактивированный актин сопровождается возрастанием анизотропии флуоресценции (рис. 8, 9). Независимость для инактивированного актина, так же как и для F-актина, величины $1/r$ от вязкости растворителя (рис. 10; Kuznetsova et al., 1988) означает, что время вращательной релаксации макромолекулы как целого для инактивированного и F-актина много больше времени жизни возбужденного состояния ответственных за флуоресценцию триптофановых остатков. В случае F-актина это связано с включением глобулы актина в полимерную цепь, в случае инактивированного актина — со специфической ассоциацией макромолекул актина при инактивации. По данным седиментационного анализа, инактивированный актин представляет собой монодисперсный и стабильный ассоциат с константой седиментации 20S (Kuznetsova et al., 1988).

Косвенные свидетельства самоассоциации макромолекул актина при инактивации могут быть получены из анализа спектров КД в дальней УФ-области спектра (Kuznetsova et al., 1988). Использование метода гель-фильтрации подтвердило монодисперсность образований, представляющих собой инактивированный актин, независимость их гидродинамических свойств от способа получения образцов инактивированного актина и концентрации препарата в пределах от 1.0000 до 0.0005 мг/мл. Радиус Стокса, определенный на основании данных гель-фильтрации (Уверский, 1998), оказался равным 28 и 80 Å для нативного и инактивированного актина соответственно. Молекулярная масса M инактивированного актина была определена на основании известного соотношения (Тенфорд, 1965):

$$M = \frac{SN_A 6\pi \eta R_s}{1 - \bar{v}_2 \rho}, \quad (5)$$

где S — коэффициент седиментации, R_s — радиус Стокса, N_A — число Авогадро, η — вязкость растворителя, ρ — плотность раствора (при бесконечном разбавлении равна плотности растворителя ρ_0), \bar{v}_2 — парциальный удельный объем растворенного вещества. Она оказалась

равной 646 кДа. Мол. масса мономерного актина составляет 42 кДа. Это означает, что в составе монодисперсного ассоциата, представляющего собой инактивированный актин, содержится 15 мономерных единиц. С учетом возможных погрешностей, связанных с калибровкой колонки, следует относиться с осторожностью к оценке размеров ассоциата. Однако можно с уверенностью говорить о том, что инактивированный актин является монодисперсным ассоциатом (Kuznetsova et al., 1999a, 1999b; Turoverov et al., 1999a).

Свойства поверхности инактивированного актина. Тенденция инактивированного актина к ассоциации была объяснена формированием обширных гидрофобных кластеров на поверхности макромолекулы инактивированного актина, наличие которых тестировали внешним гидрофобным зондом АНС. Как известно, АНС не связывается ни с нативными (растворимыми в воде белками), ни с развернутыми полипептидными цепями даже в том случае, если последние имеют в своем составе гидрофобные группы; АНС может связываться с макромолекулой белка только при наличии на ее поверхности обширных гидрофобных кластеров, при этом происходит увеличение интенсивности флуоресценции АНС (иногда в десятки раз). Для актина возрастание интенсивности АНС происходит симбатно с длинноволновым сдвигом спектра и возрастанием величины анизотропии триптофановой флуоресценции. Зависимость интенсивности флуоресценции АНС в растворе актина от концентрации мочевины или GdnHCl имеет колоколообразный характер. Интенсивность флуоресценции АНС минимальна в растворе нативного актина и при высоких концентрациях мочевины или GdnHCl, переводящих актин в полностью развернутое состояние, достигает максимума при концентрации мочевины 3.5–4.5 М (рис. 9) (Кузнецова и др., 1998; Kuznetsova et al., 1999a). В этой же области концентраций мочевины имеет место максимальная величина анизотропии триптофановой флуоресценции. При переходе от инактивированного актина в полностью развернутое состояние в области значений концентрации мочевины от 4 до 8 М зависимость интенсивности АНС от концентраций мочевины полностью обратима.

Заключение о наличии на поверхности инактивированного актина гидрофобных кластеров подтверждается появлением у инактивированного актина двух новых сайтов расщепления Ala 29—Val 30 и Ser 33—Ile 34 протеиназой ECP 32 штамма A2 *Escherichia coli* (Matveyev et al., 1996), которые в нативном актине локализованы во внутренних гидрофобных областях (Turoverov et al., 1999b). Таким образом, свойства инактивированного актина весьма необычны: на его поверхности находятся гидрофобные кластеры, в то же время полярные области, в которых локализованы ответственные за УФ-флуоресценцию триптофановые остатки, находятся во внутренних недоступных для растворителя частях макромолекулы.

Внутримолекулярная подвижность триптофановых остатков нативного и инактивированного актина. Для G-актина в отличие от инактивированного и F-актина наклон асимптоты кривой зависимости $1/r = f(T/\eta)$, полученной путем изменения вязкости смешанного водно-глицеринового растворителя, не равен нулю. В то же время, как и следовало ожидать, наклон амплитуды кривой этой зависимости для G-актина значительно меньше, чем наклон для полностью развернутого белка в 8 М мочеvine (рис. 10). Для решения вопроса о том, обусловлен ли наклон только

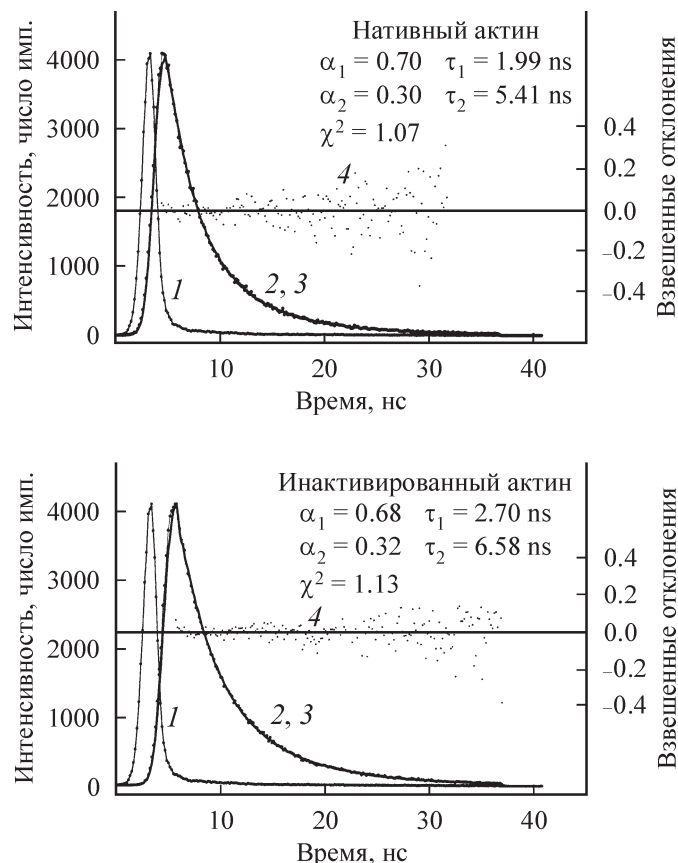


Рис. 11. Затухание флуоресценции нативного и инактивированного актина.

1 — профиль импульса лампы, 2 — кривая затухания флуоресценции, 3 — результат деконволюции, 4 — взвешенные отклонения. Приведены расчетные значения кинетических параметров. $\lambda_{\text{возб.}} = 297 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{рег.}} = 365 \text{ нм}$.

подвижностью макромолекулы как целого или, кроме того, имеет место внутримолекулярная подвижность триптофановых остатков, был выполнен специальный анализ.

Измерение кривых затухания флуоресценции (рис. 11) и определение времен жизни (табл. 4) позволили оценить время вращательной релаксации ρ . Кинетические кривые затухания флуоресценции для нативного, инактивированного и полностью развернутого актина не могут быть удовлетворительно описаны в моноэкспоненциальном приближении, но хорошо описываются биэкспоненциальными кривыми. Поскольку немонотонный характер затухания имеет место и для белков с одним триптофановым остатком, и для модельных соединений в растворе (Szabo, Rayner, 1980), обнаруженный биэкспоненциальный характер затухания не следует напрямую связывать с существованием в актине нескольких триптофановых остатков. Полученные экспериментально значения τ были использованы для оценки времени вращательной релаксации актина. Величина ρ для G-актина оказалась равной 46 нс.

Для того чтобы сделать заключение о существовании или отсутствии внутримолекулярной подвижности триптофановых остатков G-актина со временем, сопоставимым со временем жизни возбужденного состояния триптофановых остатков, значение ρ следует сравнить с расчетным значением ρ_0 , которое было определено исходя из размеров макромолекулы, ее формы и предполагае-

мой гидратации (Кузнецова и др., 1981; Туроверов, Кузнецова, 1983):

$$\rho_0 = \frac{3\eta}{kT} \frac{M}{N_A} \left(1 + \frac{\omega}{\bar{v}d} \right), \quad (6)$$

где k — постоянная Больцмана, M — молекулярная масса, N_A — число Авогадро, ω — коэффициент гидратации, \bar{v} — парциальный объем, d — удельная плотность растворителя. Расчет показал, что для G-актина $\rho_0 = 54$ нс. С учетом того, что макромолекула актина может быть вписана в прямоугольный параллелепипед со сторонами 55, 55 и 35 Å (Kabsch et al., 1990), т. е. она может быть аппроксимирована сплюснутым эллипсоидом вращения с соотношением осей 1.0 : 1.6, ρ_0 может составлять в зависимости от ориентации триптофановых остатков относительно главных осей макромолекулы от 58 до 62 нс. Сопоставление ρ и ρ_0 свидетельствует о том, что установленный экспериментально наклон асимптоты кривой зависимости $1/r = f(T/\eta)$ не может быть объяснен только подвижностью макромолекулы актина как целого; частично он обусловлен внутримолекулярной подвижностью ответственных за флуоресценцию триптофановых остатков. Расчет показал, что характерное время внутримолекулярной подвижности триптофановых остатков составляет приблизительно 180—200 нс.

Превышение величины отрезка, отсекаемого зависимостью $1/r = f(T/\eta)$ на оси ординат $1/r'_0$, над величиной $1/r'_0$ (r'_0 — предельная анизотропия триптофановой флуоресценции, отвечающая отсутствию подвижности) свидетельствует об участии триптофановых остатков G-актина также в высокочастотной внутримолекулярной подвижности (Кузнецова, Туроверов, 1983; Туроверов, Кузнецова, 1983). Поскольку амплитуда высокочастотной внутримолекулярной подвижности триптофановых остатков инaktivированного актина меньше соответствующей величины для нативного глобулярного актина и фибриллярного (рис. 10; $(1/r'_0)_{\text{инактив.}} < (1/r'_0)_G \approx (1/r'_0)_F$), независимость величины $1/r$ от вязкости растворителя для инaktivированного актина, скорее всего, обусловлена тем, что при инактивации триптофановые остатки в значительной мере или полностью утрачивают внутримолекулярную подвижность наносекундного диапазона.

Актин — отнюдь не единственный объект, денатурация которого сопровождается уменьшением подвижности триптофановых остатков. Возрастание анизотропии флуоресценции и увеличение времени вращательной релаксации при переходе из нативного в промежуточное состояние были зарегистрированы также для α -лактальбумина и карбоангидразы В в работах Гильманшина и соавторов (1982) и Родионовой и соавторов (1989). Возрастание анизотропии флуоресценции при денатурации белков плохо укладывалось в представление о том, что эти белки при денатурации переходят в состояние типа расплавленной глобулы. В настоящее время, по крайней мере для актина, понятно, что возрастание анизотропии обусловлено изменением подвижности триптофановых остатков при агрегации белка.

Сворачивание—разворачивание актина

Авторы всех работ, посвященных процессам денатурации актина, предполагали, что актин последовательно переходит от нативного к инaktivированному, а затем к

полностью развернутому состоянию (Nagy, Jencks, 1962; West et al., 1967; Lehrer, Kerwar, 1972; Nagy, Strzelecka-Golaszewska, 1972; Strzelecka-Golaszewska et al., 1974, 1985; Contaxis et al., 1977; Татунашвили, Привалов, 1984; Kuznetsova et al., 1988; Кузнецова и др., 1998; Turoverov et al., 1999b):



т. е. инaktivированный актин рассматривали во всех этих работах как промежуточное состояние между нативным и полностью развернутым состояниями белка. Результаты измерения равновесных зависимостей различных физических характеристик, казалось бы, подтверждают эту модель. Действительно, данные, представленные на рис. 8, свидетельствуют о том, что GdnHCl вызывает по мере увеличения его концентрации два последовательных конформационных перехода: переход от нативного к инaktivированному актину в области концентраций 0.0—0.8 M GdnHCl и переход от инaktivированного к полностью развернутому состоянию в области концентраций 1.8—4.0 M GdnHCl, разделенных областью концентраций 0.8—1.8 M GdnHCl, в которой актин находится преимущественно в инaktivированном состоянии. При этом переход от нативного состояния к инaktivированному является необратимым (Bertazzon et al., 1990; Le Bihan, Gicquaud, 1993; Kuznetsova et al., 1999a; Turoverov et al., 1999a; Schuler et al., 2000), поэтому все структурные характеристики актина в диапазоне низких концентраций денатуранта (0.0—0.8 M) являются квазистационарными. В связи с этим необходимо отметить, что кривые, представленные на рис. 8, были зарегистрированы после инкубации актина в течение 24 ч в растворах GdnHCl соответствующей концентрации.

Специфические взаимодействия актина с GdnHCl. Представленные на рис. 8 равновесные (квазиравновесные) зависимости характеристик собственной флуоресценции актина от концентрации GdnHCl не отражают ряда аномальных проявлений специфического взаимодействия актина с GdnHCl, имеющих место в растворах с небольшой концентрацией денатуранта. В этой области концентраций GdnHCl имеют место возрастание интенсивности флуоресценции и величины параметра A , увеличение интенсивности светорассеяния и даже преципитация актина из раствора при высокой концентрации белка. Все это определило необходимость более тщательного измерения этих зависимостей, а также расширения числа экспериментальных подходов, используемых для изучения процессов сворачивания—разворачивания актина и, в частности, использования в этих экспериментах регистрации интенсивности флуоресценции АНС и светорассеяния. Результаты этих измерений, выполненных после инкубации исходно нативного актина в растворах GdnHCl различной концентрации в течение 24 ч, представлены на рис. 12, а. На рис. 12, б представлены аналогичные зависимости, измеренные для исходно инaktivированного актина. Интенсивность флуоресценции АНС в водном растворе (0.0 M GdnHCl) в присутствии инaktivированного актина приблизительно в 20 раз больше интенсивности АНС в присутствии нативного актина той же концентрации. Максимальная интенсивность флуоресценции АНС наблюдается при концентрациях 0.45—0.50 и 0.2—0.3 M GdnHCl для растворов исходно нативного и исходно инaktivированного актина. При

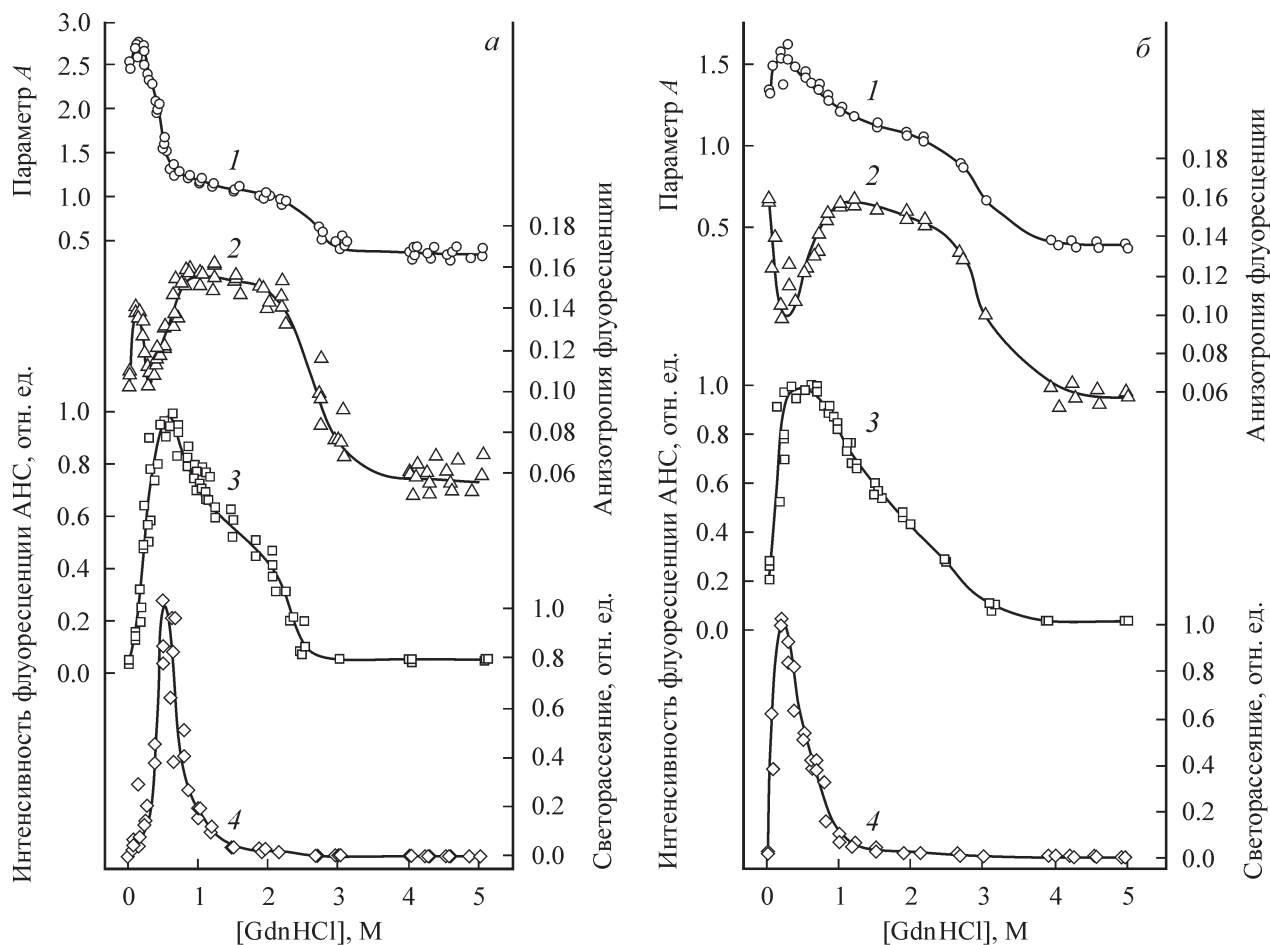


Рис. 12. Зависимость величины параметра A , анизотропии флуоресценции, интенсивности флуоресценции АНС и светорассеяния от концентрации GdnHCl для исходного нативного (а) и исходного инактивированного (б) актина.

этих же концентрациях АНС наблюдается максимальная интенсивность светорассеяния.

Сходство характера зависимостей интенсивности флуоресценции АНС и интенсивности светорассеяния для исходно нативного и исходно инактивированного актина заставляет искать причину обнаруженных эффектов в универсальном характере взаимодействия GdnHCl (при его небольших концентрациях в растворе) с макромолекулами белка. Возможно, этот эффект обусловлен взаимодействием групп NH_2 катионов GdnHCl (GuH^+) с группами $\text{C}=\text{O}$ карбоксильных групп глутаминовой и аспарагиновой кислот и амидных групп глутамина и аспарагина, находящегося на поверхности макромолекулы нативного или инактивированного актина. Число отрицательно заряженных групп OD2 (22 группы) и OE2 (28 групп) глутаминовой и аспарагиновых кислот в макромолекуле актина больше числа положительно заряженных групп NZ лизина (18 групп), NH1-групп аргинина (18 групп) и NE2-групп гистидина (9 групп). Таким образом, в целом макромолекула актина несет отрицательный заряд.

Распределение отрицательно заряженных групп OD2 и OE2, положительно заряженных NZ Lys, NE2 Arg, NH1 His, а также групп $\text{C}=\text{O}$ на поверхности макромолекулы актина представлено на рис. 13. С ростом числа ионов GuH^+ , связанных с белком, увеличивается количество положительных групп на поверхности белка, и при некоторой концентрации GdnHCl молекула в целом стано-

вится нейтральной. При этом создаются условия ассоциации макромолекул актина между собой. Это и является причиной возрастания светорассеяния и связывания молекул АНС, которые встраиваются между макромолекулами актина, образуя ассоциаты. При дальнейшем увеличении концентрации GdnHCl число положительно заряженных групп на поверхности макромолекулы белка начинает превышать число отрицательно заряженных групп. Наличие положительно заряженных групп на поверхности макромолекулы препятствует их ассоциации. То обстоятельство, что зависимости интенсивности флуоресценции АНС и интенсивности светорассеяния от концентрации GdnHCl для исходно нативного и исходно инактивированного актина имеют сходный характер, позволяет предположить, что в состав ассоциатов могут входить макромолекулы как нативного, так и инактивированного актина. Как было отмечено выше, максимумы зависимостей интенсивности флуоресценции АНС и интенсивности светорассеяния в случае исходно нативного актина наблюдаются при больших концентрациях GdnHCl по сравнению с аналогичными зависимостями для исходно инактивированного актина. Это может быть связано с тем, что поверхность инактивированного актина несет меньшее число нескомпенсированных отрицательно заряженных групп по сравнению с поверхностью нативного актина и для нейтрализации избыточно отрицательного заряда на поверхности необходимо меньшее число катионов GuH^+ .

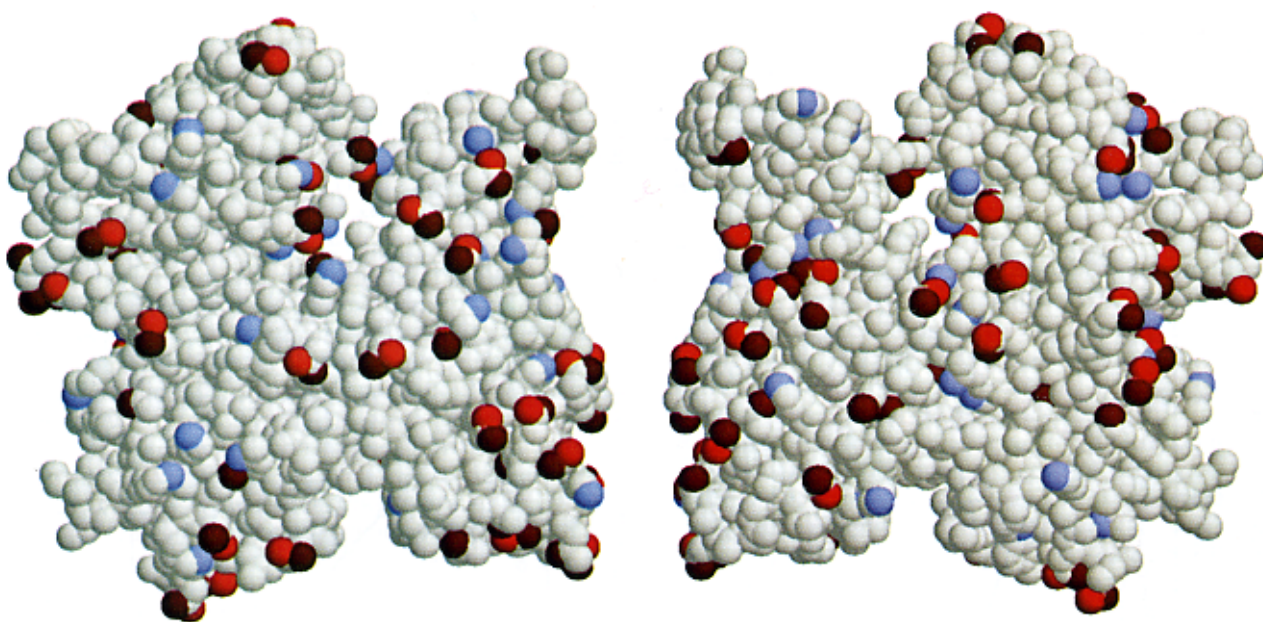


Рис. 13. Локализация отрицательно и положительно заряженных групп, а также атомов кислорода групп C=O на поверхности макромолекулы актина.

Панели *a* и *b* отличаются друг от друга поворотом молекулы на 180° вокруг вертикальной оси. Красные сферы — отрицательно заряженные атомы кислорода групп OD2, OE2 глутаминовой и аспарагиновой аминокислот; синие сферы — положительно заряженные атомы азота групп NZ, NH1 и NE2 лизина, аргинина и гистидина; темно-красные сферы — атомы кислорода групп C=O (OE1 Glu, OD1 Asp, OE1 Gln и OD1 Asn).

Если наша гипотеза верна, то это означает, что в растворах GdnHCl размер ассоциатов инактивированного актина существенно зависит от концентрации денатуранта. Подтверждением этого является характер зависимости интегральной интенсивности флуоресценции от концентрации GdnHCl. С ростом концентрации GdnHCl от 0 до 1.8 М наблюдается существенное уменьшение этой величины (Mazhul' et al., 2003; Мажуль и др., 2005). Инактивированный актин представляет собой монодисперсный ассоциат, состоящий из 15 мономерных единиц, вне зависимости от того, каким образом он получен, лишь в водном растворе в отсутствие GdnHCl.

В области концентраций GdnHCl от 1.8 до приблизительно 3.0 М зависимости интенсивности флуоресценции АНС отражают переход инактивированного актина к полностью развернутому состоянию. При этом превращение инактивированный актин — полностью развернутый актин для исходно инактивированного актина проявляется не так резко, как в случае исходно нативного актина (рис. 12, *a, б*). Это согласуется с данными, полученными при регистрации характеристик собственной флуоресценции (см. ниже), которые свидетельствуют о том, что разворачивание инактивированного актина происходит значительно медленнее, чем процесс $U \rightarrow I$.

По сравнению с зависимостями, представленными на рис. 8, выявлено возрастание величины параметра *A* и анизотропии флуоресценции в области концентраций 0.0—0.1 М GdnHCl, которое при дальнейшем увеличении концентраций денатуранта сменяется уменьшением величины этих характеристик (рис. 12, *a*). Для исходно инактивированного актина экстремумы на кривых зависимостей параметра *A*, анизотропии флуоресценции, интенсивности флуоресценции АНС и светорассеяния наблюдаются при одних и тех же концентрациях GdnHCl (рис. 12, *б*). Для исходно нативного актина максимальные значения параметра *A* и анизотропии флуоресцен-

ции наблюдаются, так же как и для исходно инактивированного актина, при концентрациях, близких к 0.2 М GdnHCl. Причины возрастания величины параметра *A* и анизотропии флуоресценции актина под воздействием небольших концентраций GdnHCl неясны. В случае нативного актина одно из возможных объяснений могло бы состоять в предположении о полимеризующем действии небольших добавок GdnHCl. Однако обнаружение этого эффекта для исходно инактивированного актина ставит под сомнение справедливость такого предположения.

Кинетика денатурации актина

Квазистационарный характер зависимостей флуоресцентных характеристик от концентрации GdnHCl в области низких концентраций денатуранта (0.0—0.8 М), а также то обстоятельство, что инактивированный актин — ассоциат из 15 мономерных единиц — не может образовываться быстро и должен существовать по крайней мере кинетический мономер — предшественник инактивированного актина, определили необходимость изучения кинетики процессов сворачивания—разворачивания актина. Существенно было использовать в этих экспериментах различные физико-химические характеристики, чувствительные как к изменению глобулярной структуры белка, так и к ассоциации макромолекул, приводящей к образованию инактивированного актина.

Существенно развернутый кинетический интермедиат, предшествующий образованию инактивированного актина. Для изучения процесса образования инактивированного актина под действием GdnHCl были измерены кинетические кривые изменения интенсивности собственной флуоресценции (Turoverov et al., 2002). При небольших концентрациях GdnHCl (меньше 1.0 М) ин-

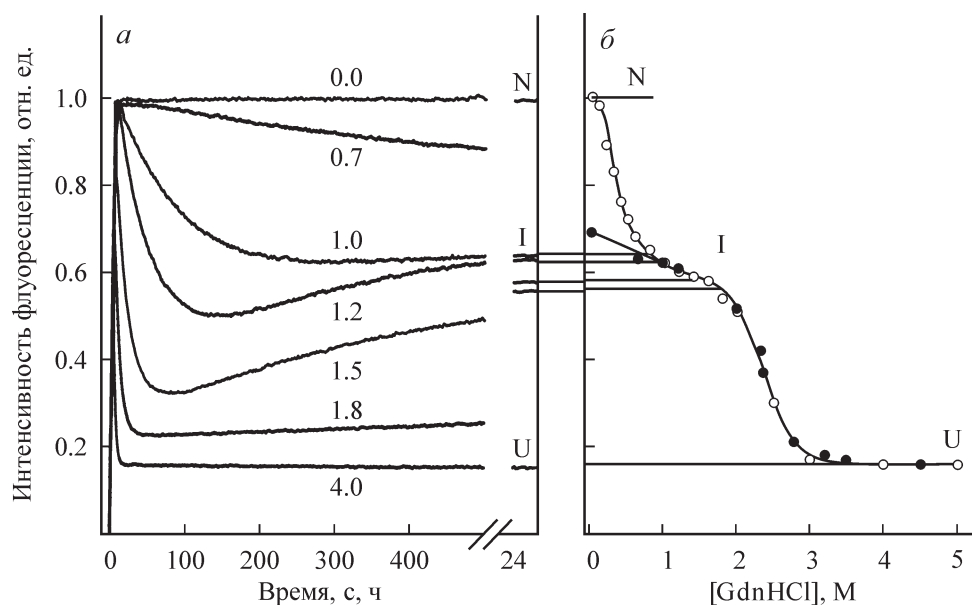


Рис. 14. Изменение интенсивности собственной флуоресценции актина при его денатурации ($\lambda_{\text{рег.}} = 320$ нм).

a — кинетика денатурации актина под действием GdnHCl. Цифры у кривых — концентрация GdnHCl, М; *б* — зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации GdnHCl, зарегистрированная после 24 ч инкубации белка в GdnHCl. $\lambda_{\text{возб.}} = 297$ нм; белые и черные символы соответствуют экспериментам по денатурации и ренатурации соответственно.

тенсивность флуоресценции монотонно уменьшается со временем, медленно достигая своей равновесной величины (рис. 14). При высокой концентрации GdnHCl (выше 3.0 М) интенсивность флуоресценции также уменьшается монотонно и быстро достигает значения, характерного для полностью развернутого актина (рис. 14, б). Наиболее интересные результаты были получены для промежуточных концентраций GdnHCl (от 1.0 до 2.0 М). При этих концентрациях GdnHCl интенсивность флуоресценции сначала падает, а затем медленно растет, достигая равновесной величины (рис. 14).

Появление минимума на кинетических кривых при конечных концентрациях GdnHCl в растворе 1.0, 1.2, 1.5 и 1.8 М свидетельствует о том, что переход из нативного в инактивированное состояние происходит через некоторое промежуточное состояние, в котором интенсивность флуоресценции, зарегистрированная при длине волны 320 нм, ниже, чем в нативном и инактивированном состояниях. Известно, что актин в полностью развернутом состоянии обладает меньшей интенсивностью I_{320} , чем в нативном и инактивированном. В связи с этим было сделано предположение о том, что инактивированный актин образуется из нативного через стадию формирования существенно развернутого интермедиата.

Дополнительное подтверждение этого предположения было получено путем регистрации кинетических зависимостей других характеристик системы, в частности характеристик, которые в противоположность интенсивности флуоресценции отражают изменение структуры макромолекулы качественно. При этом были использованы характеристики, величина которых для полностью развернутого актина ниже по сравнению с величиной для нативного и инактивированного состояний белка, а именно параметр A и анизотропия флуоресценции. Кинетические кривые, измеренные при конечной концентрации 1.0—2.0 М GdnHCl для параметра A и анизотропии флуоресценции, также имеют минимум (рис. 15, 16). Известно, что величина анизотропии флуоресценции умень-

шается с увеличением подвижности хромофора. Например, ассоциация белков обычно сопровождается увеличением анизотропии флуоресценции, в то время как диссоциация олигомеров и разворачивание белка — уменьшением анизотропии флуоресценции.

В соответствии с этим образование инактивированного актина (который, как уже говорилось ранее, состоит из 15 макромолекул актина — Kuznetsova et al., 1999a; Turoverov et al., 1999b) сопровождается существенным увеличением анизотропии флуоресценции (рис. 16). С другой стороны, разворачивание белка характеризуется выраженным спадом величины анизотропии флу-

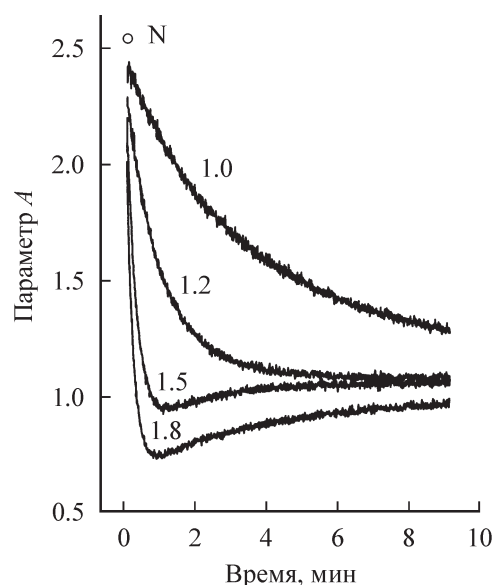


Рис. 15. Изменение параметра A при денатурации актина под действием GdnHCl.

Цифры у кривых — концентрации GdnHCl, М; $\lambda_{\text{возб.}} = 297$ нм.

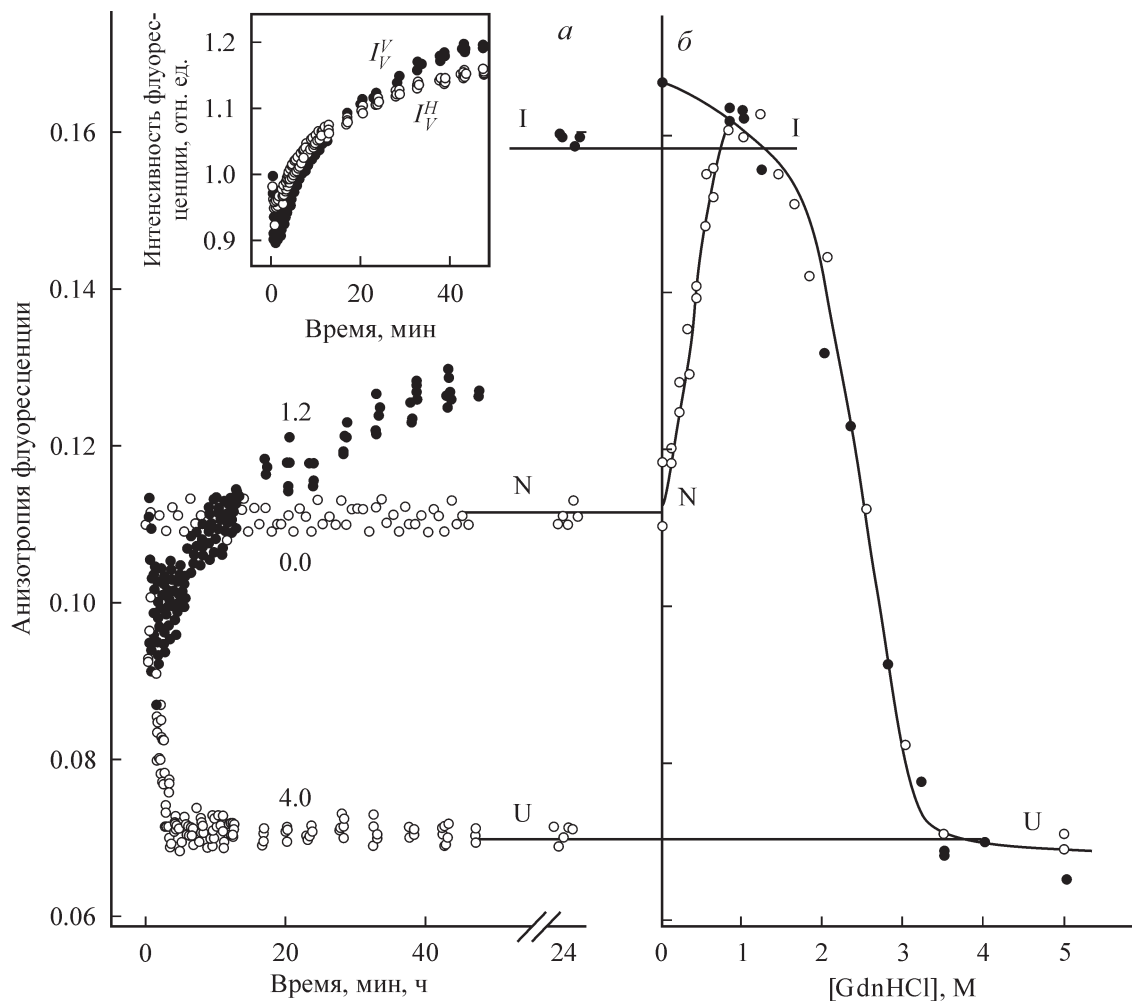


Рис. 16. Изменение анизотропии флуоресценции при денатурации актина.

a — кинетика денатурации актина под действием GdnHCl; цифры у символов — концентрации GdnHCl, М. Вставка — кинетика изменения горизонтальной (I_V^H) и вертикальной (I_V^V) составляющих интенсивности флуоресценции, *b* — зависимость величины анизотропии флуоресценции от концентрации GdnHCl, зарегистрированная после 24 ч инкубации белка в GdnHCl. $\lambda_{\text{возб.}} = 297$ нм, $\lambda_{\text{рег.}} = 365$ нм; белые и черные символы соответствуют экспериментам по денатурации и ренатурации соответственно.

оресценции (рис. 16). В то же время уменьшение величины параметра A означает длинноволновый сдвиг спектра флуоресценции, который часто связывают с разрушением глобулярной, плотно упакованной структуры и образованием более «рыхлой», развернутой структуры. Поэтому наличие минимума на кинетических кривых анизотропии флуоресценции и параметра A означает, что появлению инактивированного актина предшествует стадия образования существенно развернутого актина. Важно заметить, что со временем величина параметра A и анизотропии флуоресценции достигает значения, характерного для инактивированного актина.

Кинетические константы процесса денатурации актина гуанидингидрохлоридом. На основании всех экспериментальных данных была предложена следующая схема образования инактивированного актина:



где k_i — константы скоростей соответствующих процессов и U^* — существенно развернутый кинетический интермедиат, флуоресцентные свойства которого сходны

со свойствами полностью развернутого белка, но (как показали измерения в дальней УФ-области спектра) вторичная структура которого гораздо более упорядочена. Схема (8) верна в том случае, если конечная концентрация GdnHCl в растворе не превышает 1.8 М, в противном случае необходимо учитывать также переход актина в полностью развернутое состояние (см. ниже). В предположении выполнения схемы (8) временные зависимости долей белка в нативном $\alpha_N(t)$, инактивированном $\alpha_I(t)$ и существенно развернутом $\alpha_{U^*}(t)$ состояниях определяются следующими соотношениями:

$$\alpha_N(t) = [N(t)]/[N(0)] = e^{-k_1 t},$$

$$\alpha_I(t) = [I(t)]/[N(0)] =$$

$$= \frac{-k_2(k_1 e^{-(k_2+k_3)t} - (k_1+k_2)e^{-k_1 t} - k_1 + k_2 + k_3)}{(k_2+k_3)(k_1 - k_2 - k_3)},$$

$$\alpha_{U^*}(t) = [U^*(t)]/[N(0)] = \quad (9)$$

$$= \frac{[(-k_2 k_1 + k_3 k_2 - k_3 k_1 + k_3^2) e^{-k_1 t} - (-k_3 k_2 + k_3 k_1 - k_3^2 + k_2 k_1) e^{-(k_2 + k_3) t}]}{(k_2 + k_3)(k_1 - k_2 - k_3)}.$$

Временная зависимость интенсивности флуоресценции системы, содержащей актин в нативном, инактивированном и существенно развернутом состояниях, определяется соотношением

$$I(t) = \alpha_N(t)I_N + \alpha_I(t)I_I + \alpha_{U*}(t)I_{U*}, \quad (10)$$

где I_N , I_I и I_{U*} — интенсивности флуоресценции актина в нативном, инактивированном и существенно развернутом состояниях соответственно; $\alpha_N(t) + \alpha_I(t) + \alpha_{U*}(t) = 1$. Исключая из выражения (10) $\alpha_N(t)$ и полагая, что $I_{U*} = I_U$, имеем

$$I_r(t) = 1 + \alpha_I(t)(I_I/I_N - 1) + \alpha_{U*}(t)(I_U/I_N - 1), \quad (11)$$

где $I_r(t) = I(t)/I(0)$ — относительная интенсивность флуоресценции, $I(0) = I_N$. Величины констант скоростей были определены путем минимизации следующей функции:

$$\Phi = \sum_i [I_{r,0}(t) - I_r(\alpha_j(t, k_i))]^2, \quad (12)$$

где $I_{r,0}(t)$ и $I_r(\alpha_j(t, k_i))$ — экспериментальная и расчетная величины относительной интенсивности флуоресценции. Для анализа кинетических кривых интенсивности флуоресценции, определения констант скоростей k_i и временной зависимости доли белка в нативном, инактивированном и существенно развернутом состояниях использовали метод Маркуардта (Marquardt, 1963), который сочетает в себе свойства градиентного метода наискорейшего спуска (в его основе лежит линейная аппроксимация целевой функции) и метода Ньютона (отвечает квадратичной аппроксимации целевой функции).

Экспериментальная кинетическая кривая, которая отражает изменения интенсивности флуоресценции со временем, и расчетная кривая, наилучшим образом совпадающая с экспериментальной и полученная в рамках модели (9), представлены на рис. 17, а; обе кривые получены для конечной концентрации GdnHCl в растворе, равной 1.2 М. Наилучшее совпадение экспериментальной и расчетной кривых было достигнуто, когда $k_1 = 2.1 \cdot 10^{-2}$, $k_2 = 7.2 \cdot 10^{-3}$ и $k_3 = 7.6 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$. Расчет констант скоростей позволил определить изменения во времени долей нативного ($\alpha_N(t)$), инактивированного ($\alpha_I(t)$) и существенно развернутого ($\alpha_{U*}(t)$) состояний актина. Отклонение расчетной кривой от экспериментальной имеет статистический характер, хотя имеется небольшая нелинейность при малых временах (рис. 17, б). Близость величины χ^2 ($\chi^2 = \Phi/(n - p)$), где n — число экспериментальных точек и p — число исследуемых параметров, к единице ($\chi^2 = 1.12$) и статистический характер отклонения расчетной кривой от экспериментальной доказывают обоснованность выбранной кинетической модели.

Была определена зависимость констант скоростей k_1 , k_2 и k_3 от концентрации GdnHCl (рис. 17, в). Константа скорости k_3 , как и ожидалось, практически равна нулю. При небольших концентрациях GdnHCl величина k_2 значительно больше, чем величина k_1 . Значит, лимитирующей стадией при этих условиях является стадия раз-

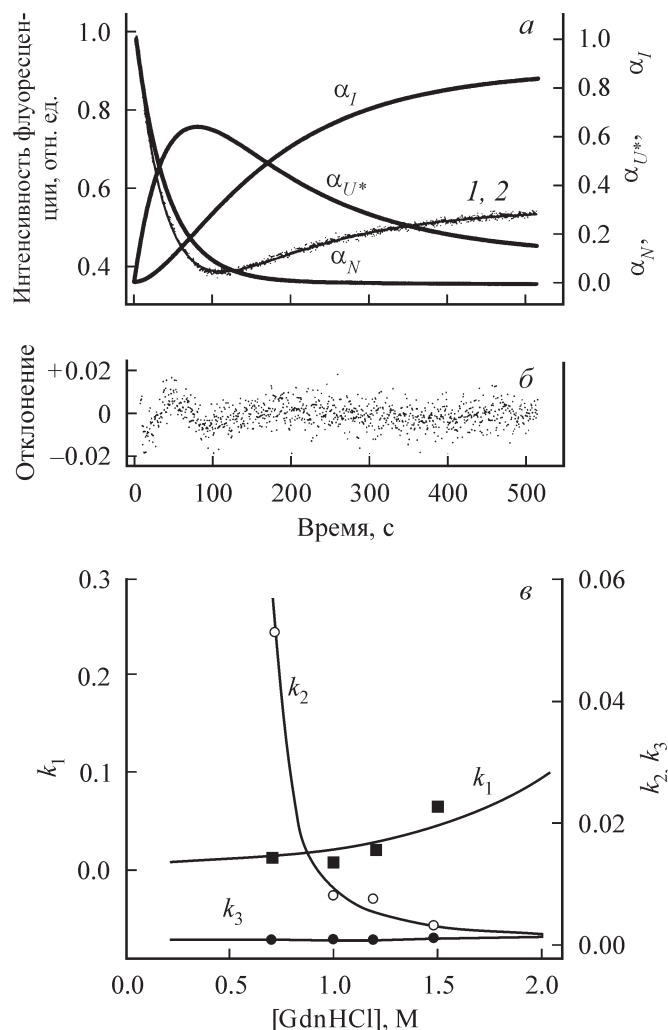


Рис. 17. Анализ кинетических кривых интенсивности собственной флуоресценции актина. $\lambda_{\text{возб.}} = 297 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{рег.}} = 320 \text{ нм}$.

а: 1, 2 — экспериментальная (точки) и расчетная (линия) кривые. Кривые α_N , α_I и α_{U*} — доли белка в нативном, инактивированном и существенно развернутом состояниях соответственно; конечная концентрация GdnHCl в растворе 1.2 М. б — отклонение экспериментальной кривой от расчетной; в — зависимость констант скоростей денатурации актина k_i от концентрации GdnHCl.

ворачивания белка, в то время как существенно развернутая молекула быстро переходит в состояние инактивированного актина. С увеличением концентрации GdnHCl константа скорости k_1 увеличивается, а константа скорости k_2 уменьшается. Это приводит к тому, что при концентрациях GdnHCl от 1.0 до 2.0 М происходит накопление существенно развернутого интермедиата на ранних стадиях в процессе денатурации и как следствие — появление характерного минимума на кинетических кривых.

Кинетика разворачивания актина формамидом. Измерены кинетические зависимости интенсивности флуоресценции при воздействии на актин формамида различной концентрации (рис. 18). Установлено, что их характер аналогичен характеру зависимостей, наблюдаемых при денатурации актина GdnHCl, и лишь скорость денатурации значительно ниже. Эти результаты подтвердили то, что формамид является классическим денатурирующим агентом, хотя и менее сильным, чем мочевины и GdnHCl. Характер кинетических зависимостей интенсивности флуоресценции (рис. 18) подтвердил предложенную на

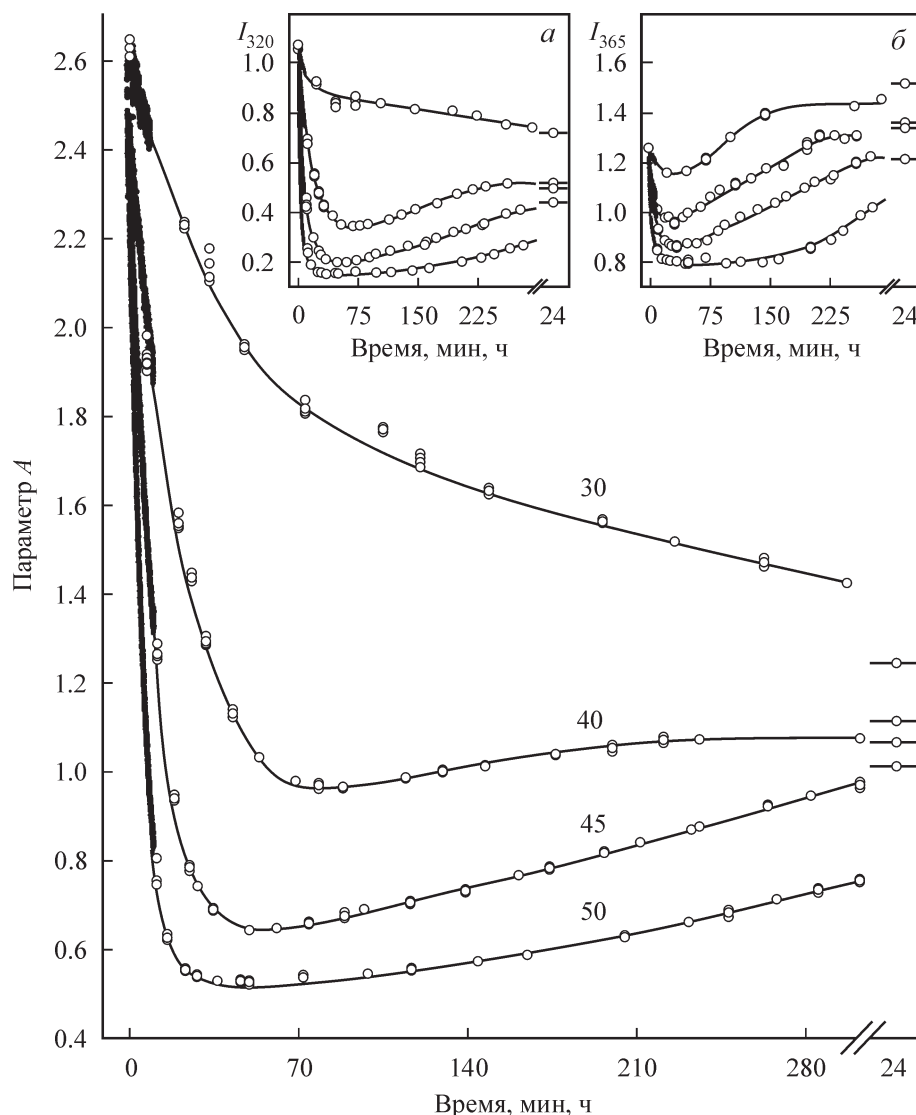


Рис. 18. Кинетика денатурации актина формалидом.

Представлены временные зависимости параметра $A = I_{320} / I_{365}$, характеризующего положение спектра флуоресценции и интенсивности флуоресценции, измеренные при длинах волн 320 (панель а) и 365 (панель б) нм. Цифры у символов — концентрации формалида, %; концентрация белка 0.5 мг/мл; $\lambda_{\text{возб.}} = 297$ нм.

основании данных по денатурации актина GdnHCl схему процессов сворачивания—разворачивания актина.

Кинетика образования инактивированного актина. Величина любой характеристики собственной флуоресценции (интенсивности, параметра A , анизотропии флуоресценции) определяется относительным вкладом всех трех компонент системы нативный актин—существенно развернутый кинетический интермедиат—инактивированный актин (см. соотношение 10). Как очевидно из материала, представленного выше, это обстоятельство оказалось очень полезным для обнаружения нового существенно развернутого кинетического интермедиата, поскольку величина всех этих характеристик для кинетического интермедиата меньше по сравнению как с нативным, так и с инактивированным актином. Для исследования кинетики образования инактивированного актина, возможно, более удобно использовать такие характеристики, величина которых не зависит от присутствия в системе одной или двух других компонент. Такими характеристиками могут быть интенсивность флуоресценции АНС, интегральная интен-

сивность и среднее время затухания флуоресценции при комнатной температуре.

Флуоресценция АНС. Флуоресцентный зонд АНС, как известно, не флуоресцирует в водном растворе в свободном состоянии. Как правило, он не связывается с нативными белками, поэтому их присутствие в растворе АНС не приводит к возникновению флуоресценции зонда. Исключение составляют лишь некоторые белки (например, сывороточные альбумины), имеющие гидрофобные полости или гидрофобные кластеры на поверхности макромолекулы. АНС не связывается также с полностью развернутыми белками. Возникновение интенсивной флуоресценции АНС является классическим и широко используемым тестом на присутствие (или возникновение) в растворе белка в денатурированном частично свернутом состоянии типа расплавленной глобулы. Флуоресценция АНС в этом случае обусловлена связыванием красителя с гидрофобными кластерами на поверхности макромолекулы. АНС может также эффективно связываться с аморфными агрегатами белков.

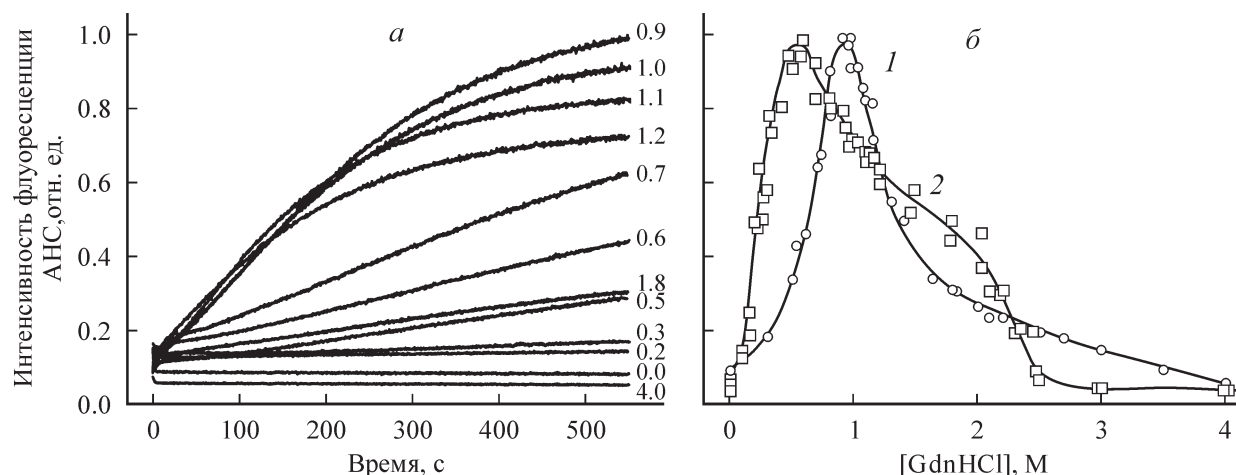


Рис. 19. Денатурация актина под действием GdnHCl, зарегистрированная путем измерения интенсивности гидрофобного зонда АНС.

a — кинетические кривые денатурации актина под действием GdnHCl различной концентрации. Цифры у кривых — концентрации GdnHCl, М; *b* — квазистационарные зависимости интенсивности флуоресценции АНС от концентрации GdnHCl, измеренные через 10 мин (1) и через 24 ч (2) инкубации в растворах GdnHCl; концентрация белка 0.15 мг/мл.

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

На рис. 19 представлены кинетические зависимости изменения интенсивности флуоресценции АНС при разворачивании актина GdnHCl. Видно, что начальная скорость образования продукта, связывающего АНС, возрастает по мере увеличения конечной концентрации GdnHCl от 0 до 1.2 М. Однако при концентрациях GdnHCl 1.0, 1.1 и 1.2 М скорость образования этого продукта затем существенно замедляется, так что через 10 мин после начала инкубации актина в растворах GdnHCl максимальная концентрация этого продукта имеет место при конечной концентрации 0.9 М GdnHCl. При концентрации 1.8 М GdnHCl скорость нарастания интенсивности флуоресценции АНС значительно меньше, чем при концентрации 0.9 М GdnHCl. При обсуждении зависимостей, представленных на рис. 19, мы сознательно использовали термин «продукт, связывающий АНС», а не инактивированный актин, поскольку ассоциаты актина, связывающие АНС, вряд ли гомогенны. Размеры этих ассоциатов могут зависеть как от времени инкубации актина в растворе GdnHCl, так и от концентрации денатурирующего агента. Не исключено, что по достижении равновесия размер ассоциатов также будет зависеть от концентрации GdnHCl.

Фосфоресценция при комнатной температуре (ФКТ) имеет место в тех случаях, когда хромофоры белка находятся в жестком микроокружении. Ранее было показано, что нативный актин фосфоресцирует при комнатной температуре (Strambini, Lehrer, 1991; Mazhul' et al., 2003). Характер спектров КД в ближней УФ-области спектра для инактивированного актина свидетельст-

вует о том, что триптофановые остатки находятся в жестком микроокружении. На основании этого было предположено, что инактивированный актин также должен иметь ФКТ. Было показано, что кинетика затухания фосфоресценции инактивированного актина удовлетворительно аппроксимируется суммой двух экспонент. Оказалось, что среднее время затухания τ и времена τ_1 и τ_2 ФКТ инактивированного актина существенно больше, чем у нативного. Очевидно, что существенно развернутый кинетический интермедиат, так же как и полностью развернутый актин, не должен фосфоресцировать при комнатной температуре. Поэтому его присутствие в системе должно приводить к уменьшению интегральной интенсивности фосфоресценции и не сказываться на среднем времени затухания фосфоресценции. Среднее время затухания фосфоресценции будет определяться только соотношением вкладов нативного и инактивированного актина в системе (Mazhul' et al., 2003; Мажуль и др., 2005). Эти особенности характеристик ФКТ позволили на основании экспериментов по изучению кинетики разворачивания актина с помощью метода ФКТ прийти к заключению о том, что инактивированный актин образуется из существенно развернутого кинетического интермедиата U^* путем постепенного наращивания массы ассоциата (Mazhul' et al., 2003; Мажуль и др., 2005).

Новая кинетическая схема процессов сворачивания—разворачивания актина

Для того чтобы понять роль промежуточного состояния U^* в общей схеме процессов сворачивания—разворачивания актина, необходимо было охарактеризовать свойства актина в этом состоянии и ответить на вопрос о том, не идентично ли это состояние полностью развернутому состоянию U .

Важную информацию о свойствах вновь обнаруженного существенно развернутого кинетического интермедиата дали измерения кинетики изменений КД в дальней УФ-области спектра под действием GdnHCl. Величины эллиптичности в дальней УФ-области спектра, измеренные непосредственно после добавления раствора

GdnHCl, имеют промежуточные значения между величинами эллиптичности в спектрах КД для полностью развернутого и инактивированного белков, в то время как длительная инкубация белка в присутствии денатуранта (в течение 24 ч) приводит к появлению спектра КД, характерного для инактивированного актина, что также подтверждает предположение о наличии существенно развернутого промежуточного состояния белка, предшествующего образованию инактивированного актина. Таким образом, вновь обнаруженный существенно развернутый кинетический интермедиат U^* в отличие от актина в полностью развернутом состоянии U сохраняет элементы вторичной структуры.

С целью более полной характеристики свойств состояния U^* был использован так называемый метод фазовых диаграмм. Прежде чем обсуждать полученные результаты, необходимо дать представление о сути этого метода.

Построение параметрических зависимостей между двумя независимыми экстенсивными характеристиками системы — новый подход для изучения процессов сворачивания—разворачивания белков. Этот метод основан на том, что любая экстенсивная характеристика системы, состоящей из двух компонент, определяется простым соотношением

$$\begin{cases} I(\theta) = \alpha_1(\theta)I_1 + \alpha_2(\theta)I_2, \\ \alpha_1(\theta) + \alpha_2(\theta) = 1, \end{cases} \quad (13)$$

где I_1 и I_2 — значения характеристики $I(\theta)$, отвечающие 100%-ному содержанию в системе первой и второй компонент соответственно, а $\alpha_1(\theta)$ и $\alpha_2(\theta)$ — относительные доли этих компонент в системе, θ — любой параметр, в зависимости от величины которого изменяется доля компонент в системе. В качестве такого параметра могут быть, например, концентрация денатуранта, температура и т. п. Для любых двух независимых экстенсивных характеристик (описывающих систему количественно) выполняется соотношение (13), и доля компонент в системе, так же как и константа равновесия K , может быть определена с помощью простых соотношений

$$\alpha_1 = \frac{I(\theta) - I_2}{I_1 - I_2}, \quad \alpha_2 = \frac{I_1 - I(\theta)}{I_1 - I_2}, \quad K(\theta) = \frac{I_1 - I(\theta)}{I(\theta) - I_2}. \quad (14)$$

В качестве двух независимых экстенсивных характеристик системы могут быть взяты интенсивности флуоресценции, зарегистрированные при двух длинах волн (320 и 365 нм). В этом случае имеем систему

$$\begin{cases} I_{320}(\theta) = \alpha_1 I_{1,320} + \alpha_2(\theta) I_{2,320} \\ I_{365}(\theta) = \alpha_1 I_{1,365} + \alpha_2(\theta) I_{2,365} \end{cases} \quad (15)$$

Исключая $\alpha_1(\theta)$ и $\alpha_2(\theta)$ из уравнений (15), мы получим зависимость между $I_{320}(\theta)$ и $I_{365}(\theta)$

$$I_{320}(\theta) = a + b I_{365}(\theta), \quad (16)$$

где $a = I_{1,320} - \frac{I_{1,320} - I_{2,320}}{I_{1,365} - I_{2,365}} I_{1,365}$ и $b = \frac{I_{1,320} - I_{2,320}}{I_{1,365} - I_{2,365}}$. Соотно-

шение (16) означает, что если при изменении параметра θ 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 должна быть линейной. Если экспериментально зарегистрированная 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.

Впервые подход для изучения конформационных превращений белков, основанный на построении параметрических зависимостей интенсивности флуоресценции, зарегистрированных при двух длинах волн, был предложен Бурштейном (1976), но в последующие годы использовался крайне редко (см., например: Permyakov et al., 1980). Мы использовали этот метод для доказательства существования нескольких промежуточных состояний, которые возникают в процессе денатурации таких белков, как карбоангидраза (Bushmarina et al., 2001) и креатинкиназа (Kuznetsova et al., 2002b), под воздействием GdnHCl. В работе по изучению процессов сворачивания—разворачивания актина этот метод впервые был использован для анализа данных, полученных в ходе выполнения кинетических экспериментов (Kuznetsova et al., 2002a).

Свойства кинетического предшественника инактивированного актина. Параметрические зависимости между I_{320} и I_{365} построены на основе кинетических дан-

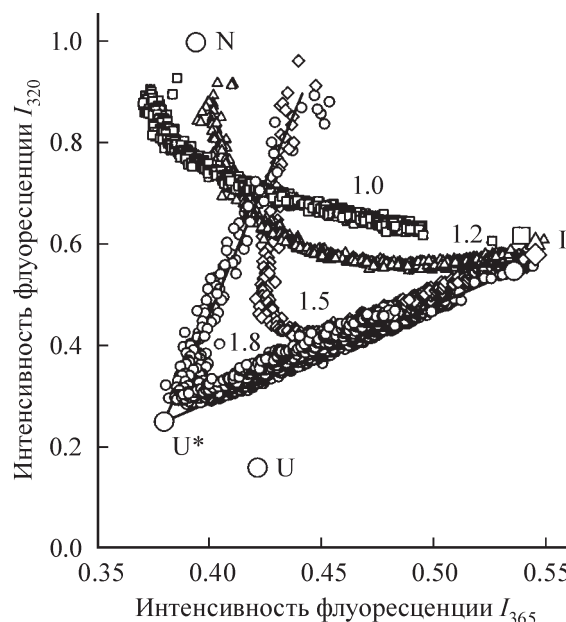


Рис. 20. Параметрические зависимости между интенсивностями флуоресценции I_{320} и I_{365} , характеризующие кинетику разворачивания нативного актина под действием GdnHCl.

Параметром выступает время, прошедшее после добавления к нативному актину растворов GdnHCl различной концентрации; цифры у символов — концентрации GdnHCl, М. Большая часть экспериментальных точек соответствует первым 10 мин после перевода белка в растворы GdnHCl соответствующей концентрации. Конечные точки (символы большого размера) зарегистрированы после 24 ч инкубации. За единицу принята интенсивность флуоресценции нативного актина. $\lambda_{\text{пер.}} = 320$ нм.

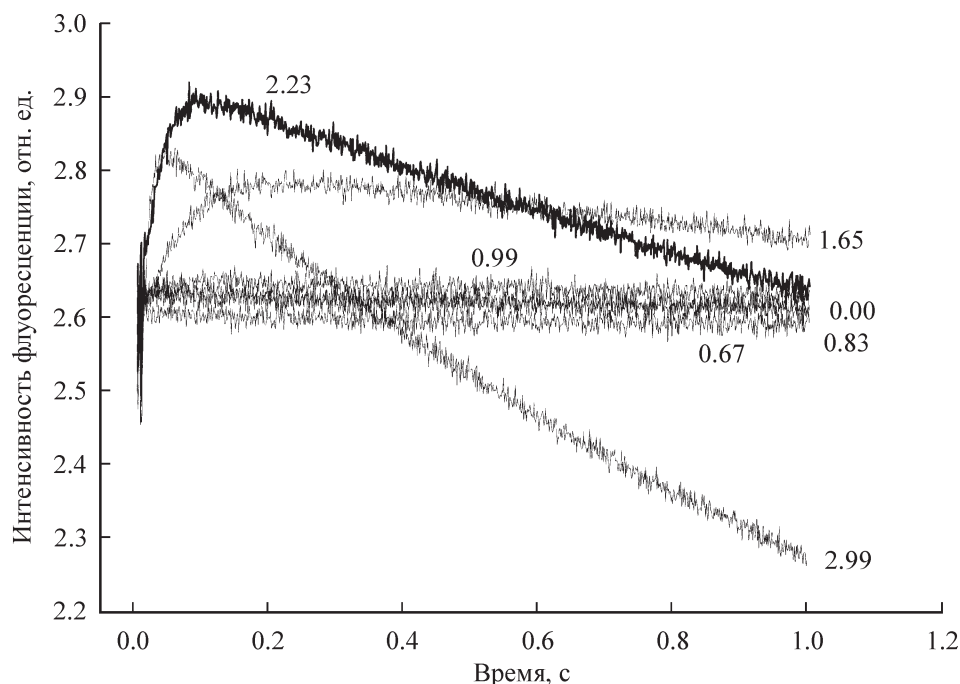


Рис. 21. Быстрая кинетика разворачивания актина под действием GdnHCl.

Цифры у кривых — концентрации GdnHCl, М.

ных, зарегистрированных в процессе разворачивания актина под действием GdnHCl (рис. 20). В качестве независимых экстенсивных характеристик системы использованы интенсивности флуоресценции, измеренные при длинах волн 320 и 365 нм. Параметром выступало время, прошедшее после добавления к нативному актину растворов GdnHCl различной концентрации.

Результаты исследования денатурации актина под действием GdnHCl позволили предположить, что константа скорости процесса $N \rightarrow U^*$ (k_1) увеличивается с увеличением конечной концентрации GdnHCl, в то время как константа скорости образования инактивированного актина $U^* \rightleftharpoons I$ (k_2) уменьшается. Зависимость между константами k_1 и k_2 такова, что процессы образо-

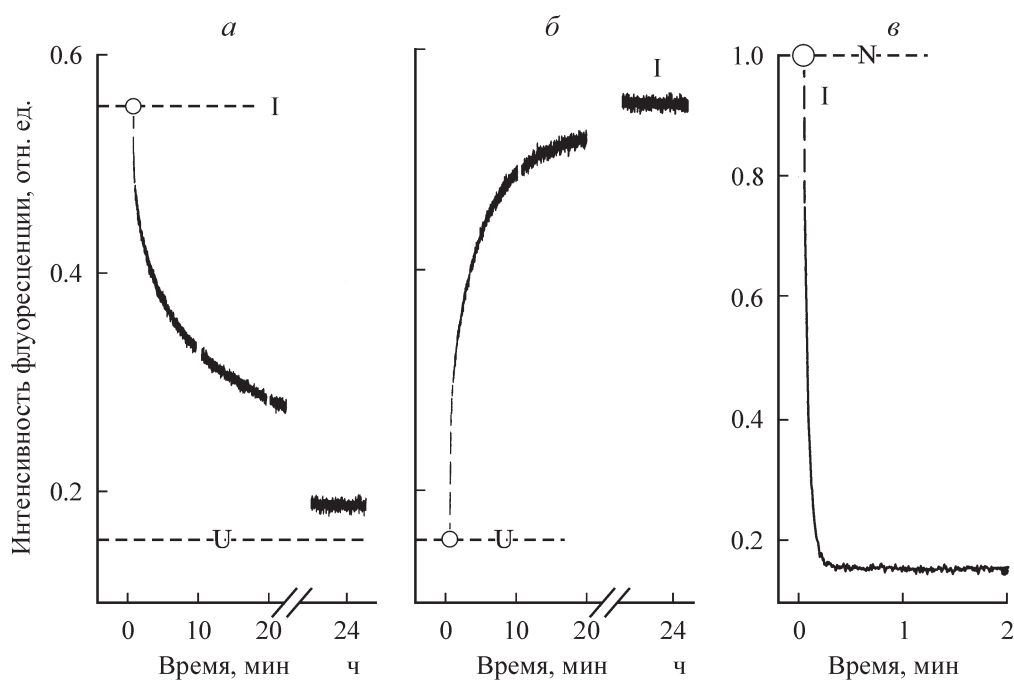


Рис. 22. Изменение интенсивности собственной флуоресценции актина при конформационном переходе инактивированный актин (I) — полностью развернутое состояние (U).

а — переход $I \rightarrow U$ при изменении концентрации GdnHCl от 1.8 до 4.0 М; б — переход $U \rightarrow I$ при изменении концентрации GdnHCl от 4.0 до 1.8 М; в — денатурация нативного актина под действием 4.0 М GdnHCl (зависимость представлена для сравнения).

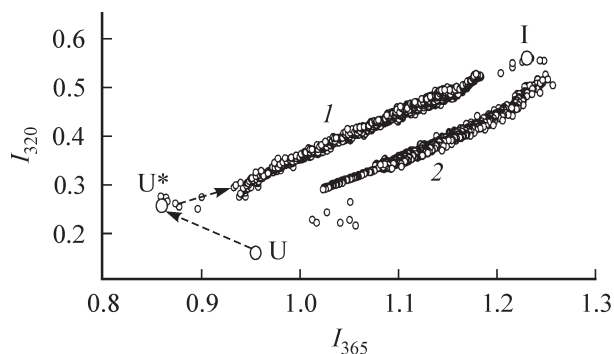


Рис. 23. Параметрические зависимости между интенсивностью флуоресценции I_{320} и I_{365} , характеризующие кинетику разворачивания инактивированного актина (1) и частичного сворачивания полностью развернутого актина (2), вызванных изменением концентрации GdnHCl от 1.8 до 4.0 и от 4.0 до 1.8 М соответственно.

Параметр — время, прошедшее после изменения концентрации GdnHCl. За единицу принята интенсивность флуоресценции нативного актина. $\lambda_{\text{рег.}} = 320$ нм.

вания существенно развернутого кинетического интермедиата и инактивированного актина разделены во времени при концентрации GdnHCl 1.8 М (см. выше). Более того, соответствующая параметрическая зависимость, представленная на рис. 20, может быть аппроксимирована двумя прямыми линиями. Очевидно, что точка пересечения этих двух линий характеризует флуоресцентные свойства кинетического предшественника инактивированного актина. Значения интенсивностей флуоресценции актина в состоянии U^* — $(I_{U^*}/I_N)_{320}$ и $(I_{U^*}/I_N)_{365}$ — равны соответственно 0.25 и 0.97, в то время как для полностью развернутого актина эти значения равны 0.16 и 1.08 соответственно. Изучение кинетических зависимостей позволяет сделать вывод о том, что $A_{U^*} > A_U$, $I_{320, U^*} > I_{320, U}$, $I_{365, U^*} < I_{365, U}$. Последнее обусловлено тем, что остатки Trp 340 и Trp 365, которые вносят значительный вклад в спектр флуоресценции нативного актина (Kuznetsova et al., 1999c), удерживают немного более коротковолновый спектр в состоянии U^* , чем они же в полностью развернутом состоянии. В то время как Trp 79 и Trp 86, у которых спектр флуоресценции сдвинут в длинноволновую сторону, но вклад в спектр флуоресценции нативного актина мал, в состоянии U^* остаются затухающими атомами серы цистеина и метионина.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что флуоресцентные свойства кинетического интермедиата отличаются от свойств, присущих актину в полностью развернутом состоянии. Кинетический интермедиат имеет более коротковолновый спектр флуоресценции по сравнению со спектром полностью развернутого актина. Показано, что в состоянии U^* макромолекула белка сохраняет элементы вторичной структуры. В то же время гидрофобный флуоресцентный зонд АНС не связывается с этим кинетическим интермедиатом.

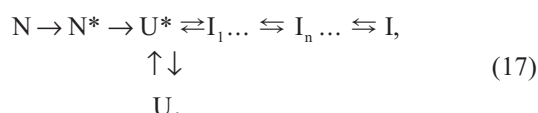
С уменьшением концентрации GdnHCl параметрические зависимости между I_{320} и I_{365} все больше и больше отличаются от параметрических зависимостей, полученных для растворов с конечной концентрацией GdnHCl 1.8 М. Для более низких концентраций GdnHCl линейную часть на параметрических зависимостях между I_{320} и I_{365} невозможно различить. Это значит, что в любой отрезок времени в растворе существует более двух компонент.

Тем не менее характер кривых свидетельствует о том, что образование инактивированного актина происходит через стадию образования существенного развернутого белка, хотя время жизни этого состояния уменьшается с уменьшением конечной концентрации GdnHCl состояния.

Быстрая кинетика. Было обнаружено, что параметрические зависимости между I_{320} и I_{365} исходят из разных точек, а не из точки, которая соответствует нативному актину в отсутствие GdnHCl (рис. 20). Одно из возможных объяснений этого эффекта состоит в предположении о существовании какого-то быстрого конформационного превращения, которое невозможно выявить в экспериментах с ручным смешиванием. Для проверки этого предположения были выполнены эксперименты по изучению быстрой кинетики структурных превращений актина под действием GdnHCl различной концентрации (рис. 21), выполненные с использованием оборудования стоп-флоу фирмы Bio-Logic в лаборатории д-ра Форже (СЕА, Гренобль). Эти эксперименты подтвердили предположение о существовании интермедиата N^* , предшествующего образованию существенно развернутого кинетического интермедиата U^* .

Кинетика перехода инактивированный актин — полностью развернутый актин. Изучение процессов сворачивания — разворачивания актина и определение роли инактивированного актина и его кинетического предшественника в этих процессах не будут полными без рассмотрения перехода между инактивированным и полностью развернутым актином. Результаты стационарных экспериментов (Kuznetsova et al., 1999a; Turoverov et al., 1999a, 2002) показали, что этот процесс обратим и протекает в области концентраций GdnHCl от 1.8 до 3.5 М с серединой перехода при 2.5 М (рис. 8). Характер временных зависимостей интенсивности флуоресценции при переводе актина из раствора GdnHCl с концентрацией 1.8 М в раствор с концентрацией 4.0 М (рис. 22, а) и из 4.0 в 1.8 М GdnHCl подтверждает заключения, сделанные на основании стационарных кривых. Следует отметить, что переход от полностью развернутого актина к инактивированному (рис. 22, б) протекает быстрее, чем обратный. Инактивированный актин не разворачивается полностью даже через 24 ч после его перевода в раствор с 4 М GdnHCl (рис. 22, а). Интересно, что нативный актин полностью разворачивается через 10 с после его перевода в 4.0 М раствор GdnHCl (рис. 22, в). Немоноэкспоненциальный характер временных зависимостей интенсивности флуоресценции, отвечающих переходам $I \rightarrow U$ и $U \rightarrow I$, и характер параметрических зависимостей между I_{320} и I_{365} (рис. 23) свидетельствуют о том, что эти переходы не являются одностадийными. По-видимому, переход $U \rightarrow I$ происходит через образование кинетического интермедиата U^* (рис. 23, кривая 1). Когда смешение раствора осуществляется вручную, процесс $U \rightarrow U^*$, по-видимому, протекает за «мертвое время» эксперимента. Вероятно, зависимость флуоресцентных характеристик инактивированного актина от концентрации GdnHCl обуславливает существование «быстрой фазы» процесса $I \rightarrow U$. Этим можно объяснить несовпадение параметрических зависимостей на участках 1 и 2 для переходов $U^* \rightarrow I$ (отрезок 1 параметрической зависимости на рис. 23) и $I \rightarrow U^*$ (отрезок 2 параметрической зависимости на рис. 23).

На основании всех представленных выше данных была предложена следующая схема разворачивания актина под действием GdnHCl (Kuznetsova et al., 2002a):



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

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-49622), программы президента РАН «Молекулярная и клеточная биология» и INTAS (грант 01-2347).

Список литературы

Буриштейн Э. А. 1976. Люминесценция белковых хромофоров. Итоги науки и техники. Сер. «Биофизика». Т. 7. М.: ВИНИТИ.

Гильманин Р. И., Долгих Д. А., Птицын О. Б., Финкельштейн А. В., Шахнович Е. И. 1982. Белковые глобулы без уникальной пространственной структуры: экспериментальные данные для α -лактальбуминов и общая модель. Биофизика. 27 (6) : 1005—1015.

Кузнецова И. М., Туроверов К. К. 1983. Поляризация собственной флуоресценции белков. III. Внутримолекулярная подвижность триптофановых остатков. Молекуляр. биол. 17 (4) : 741—754.

Кузнецова И. М., Туроверов К. К. 1998. Что определяет характеристики собственной УФ-флуоресценции белков? Анализ свойств микроокружения и особенностей локализации их триптофановых остатков. Цитология. 40 (8/9) : 747—762.

Кузнецова И. М., Хайтлина С. Ю., Туроверов К. К. 1998. Структурные свойства инактивированного актина: интермедиат формируется в процессе сворачивания—разворачивания актина. Биоорганич. химия. 24 (12) : 783—791.

Кузнецова И. М., Хайтлина С. Ю., Туроверов К. К., Пинаев Г. П. 1981. Поляризация УФ-флуоресценции актина. Биофизика. 26 (4) : 762—764.

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 амилонидных фибрилл, образующихся в результате неправильного фолдинга белков. Цитология. 47 (11) : 978—987.

Родионова Н. А., Семисотнов Г. В., Кутышенко В. П., Уверский В. Н., Болотина И. А. 1989. Стадийность равновесного разворачивания карбоангидразы В сильными денатурантами. Молекуляр. биол. 23 (3) : 683—692.

Татунашвили Л. В., Привалов П. Л. 1984. Калориметрическое исследование денатурации G-актина. Биофизика. 29 (4) : 583—585.

Тенфорд Ч. 1965. Физическая химия полимеров. М.: Химия. 420 с.

Туроверов К. К., Кузнецова И. М. 1983. Поляризация собственной флуоресценции белков. II. Использование для изучения равновесной динамики триптофановых остатков. Молекуляр. биол. 17 (3) : 468—473.

Уверский В. Н. 1998. Разнообразие компактных форм денатурированных белков: Дис. ... докт. физ.-мат. наук. Пушкино.

Agekyan T. V., Bezborodova S. I., Kuznetsova I. M., Polyakov K. M., Turoverov K. K. 1988. Spectral and polarization characteristics of ribonuclease C2. Unusual fluorescence of tyrosine residues. Mol. Biol. 22 : 612—623.

Bernstein F. C., Koetzle T. F., Williams G. J. B., Meyer E. F., Jr., Brice M. D., Rodgers J. R., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M. 1977. The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecules structures. J. Mol. Biol. 112 : 535—542.

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.

Bushmarina N. A., Kuznetsova I. M., Biktashev A. G., Turoverov K. K., Uversky V. N. 2001. Partially folded conformations in the folding pathway of bovine carbonic anhydrase II: a fluorescence spectroscopic analysis. ChemBioChem. 2 : 813—821.

Carrell R. W., Gooptu B. 1998. Conformational changes and disease-serpins, prions and Alzheimer's. Curr. Opin. Struct. Biol. 8 : 799—809.

Chen Y., Barkley M. D. 1998. Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. Biochemistry. 37 : 9976—9982.

Chen Y., Liu B., Yu H.-T., Barkley M. D. 1996. The peptide bond quenches indole fluorescence. J. Amer. Chem. Soc. 118 : 9271—9278.

Contaxis C. C., Bigelow C. C., Zarkadas C. G. 1977. The terminal denaturation of bovine cardiac G-actin. Can. J. Biochem. 55 : 325—331.

Dale R. E., Eisinger J. 1974. Intramolecular distances determined by energy transfer. Dependence on orientational freedom of donor and acceptor. Biopolymers. 13 : 1573—1605.

DeYoung L. R., Fink A. L., Dill K. 1993. Aggregation of globular proteins. Acc. Chem. Res. 26 : 614—620.

Doyle T. C., Hansen J. E., Reisler E. 2001. Tryptophan fluorescence of yeast actin resolved via concerted mutations. Biophys. J. 80 : 427—434.

Eftink M., Ghiron C. A. 1981. Fluorescence quenching studies with proteins. Anal. Biochem. 114 : 199—227.

Eisinger J., Feuer B., Lamola A. A. 1969. Intramolecular singlet excitation transfer. Applications to polypeptides. Biochemistry. 8 : 3908—3915.

Finazzi-Argo A., Rotilio G., Avigliano L., Guerrieri P., Boffi V., Mondovi B. 1970. Environment of copper in Pseudomonas fluorescens azurin: fluorometric approach. Biochemistry. 9 : 2009—2014.

Fink A. L. 1995. Molten globules. Methods Mol. Biol. 40 : 343—360.

Fink A. L. 1998. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. Fold. Des. 3 : 9—23.

Forster Th. 1960. Transfer mechanisms of electronic excitation energy. Rad. Res. Suppl. 2 : 326—339.

Frankel S., Condeelis J., Leinwand L. 1990. Expression of actin in Escherichia coli: aggregation, solubilization, and functional analysis. J. Biol. Chem. 265 : 17 980—17 987.

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.

Humphrey W., Dalke A., Schulten K. 1996. VMD: visual molecular dynamics. J. Mol. Graphics. 14 : 33—38.

Joly M. 1965. A physico-chemical approach to the denaturation of proteins. In: Molecular biology — an International series of monographs and textbooks. London; New York: Acad. Press. Vol. 6.

Kabsch W., Mannherz H. G., Suck D., Pai E. F., Holmes H. C. 1990. Atomic structure of the actin: DNase I complex. Nature. 347 : 37—44.

Kelly J. W. 1997. Amyloid fibril formation and protein misassembly a structural quest for insight into amyloid and prion diseases. Structure. 5 : 595—600.

Kelly J. W. 2000. Mechanisms of amyloidogenesis. Nature Struct. Biol. 7 : 824—826.

Koo E. H., Lansbury P. T., Jr., Kelly J. W. 1999. Amyloid disease abnormal protein aggregation in neurodegeneration. Proc. 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. 2002a. The place of inactivated actin and its kinetic predecessor in actin folding—unfolding. *Biochemistry.* 41 : 13 127—13 132.
- Kuznetsova I. M., Stepanenko Olga V., Stepanenko Olesia V., Povarova O. I., Biktashev A. G., Verkhusha V. V., Shavlovsky M. M., Turoverov K. K. 2002a. The place of inactivated actin and its kinetic predecessor in actin folding—unfolding. *Biochemistry.* 41 : 13 127—13 132.
- Kuznetsova I. M., Stepanenko Olga V., Turoverov K. K., Zhu L., Zhou J.-M., Fink A. L., Uversky V. N. 2002b. Unravelling multistate unfolding of rabbit muscle creatine kinase. *Biochim. biophys. acta.* 1596 : 138—155.
- Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Uversky V. N. 1999b. Inactivated actin, and aggregate comprised of partially-folded monomers, has a overall native-like packing density. *Protein Peptide Lett.* 6 : 173—178.
- Kuznetsova I. M., Yakusheva T. A., Turoverov K. K. 1999c. Contribution of separate tryptophan residues to intrinsic fluorescence of actin. Analysis 3D structure. *FEBS Lett.* 452 : 205—210.
- 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.
- Marquardt D. W. 1963. An algorithm for least-squares estimation of non linear parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* 11 : 431—441.
- Matveyev V. V., Usmanova A. M., Morozova A. V., Collins J. H., Khaitlina S. Yu. 1996. Purification and characterization of the proteinase ECP 32 from *Escherichia coli* A2 strain. *Biochim. biophys. acta.* 1296 : 55—62.
- Mazhul' V. M., Zaitseva E. M., Shavlovsky M. M., Stepanenko Olesia V., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K. 2003. Monitoring of actin unfolding by room temperature tryptophan phosphorescence. *Biochemistry.* 42 : 13 551—13 557.
- McLaughlin P. J., Gooch J. T., Mannherz H. G., Weeds A. G. 1993. Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature.* 364 : 685—692.
- Merrit E. A., Bacon D. J. 1977. Raster 3D: photorealistic molecular graphics. *Methods in Enzymol.* 277 : 505—524.
- Mulqueen P. M., Kronman M. J. 1982. Binding of naphthalene dyes to the N and A conformers of bovine alpha-lactalbumin. *Arch. Biochem. Biophys.* 215 : 28—39.
- 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.
- Otterbein L. R., Graceffa P., Dominquez R. 2001. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science.* 293 : 708—711.
- Permyakov E. A., Yarmolenko V. V., Emelyanenko V. I., Burshtein E. A., Closset J., Gerday C. 1980. Fluorescence study of the calcium binding to whiting (*Gadus merlangus*) parvalbumin. *Eur. J. Biochem.* 109 : 307—315.
- Pollard T. D., Blanchoin L., Mullins R. D. 2000. Molecular mechanism controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 20 : 545 : 576.
- Robinson R. G., Mejillano M., Le V. P., Burtinck L. D., Yin H. L., Choe S. 1999. Domain movement in gelsolin: a calcium-activated switch. *Science.* 286 : 1939—1942.
- Schuler H., Lindberg U., Schutt C. E., Karlsson R. 2000. Thermal unfolding of G-actin monitored with DNase-I-inhibition assay stabilities of actin isoforms. *Eur. J. Biochem.* 267 : 476—486.
- Schutt C. E., Myslik J. C., Rozycki M. D., Goonesekere N. C., Lindberg U. 1993. The structure of crystalline profilin-β-actin. *Nature.* 365 : 810—816.
- Sheterline P., Clayton J., Sparrow J. 1998. Actin. *Protein Profile.* Oxford: Oxford Univ. Press. 271 p.
- Speed M. A., Wang D. I., King J. 1996. Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition. *Nat. Biotechnol.* 14 : 1283—1287.
- Steinberg I. 1971. Long-range nonradiative transfer of electronic excitation energy in proteins and polypeptides. *Ann. Rev. Biochem.* 40 : 83—114.
- 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.
- Strzelecka-Golaszewska H., Venyaminov S. Yu., Zmorzynski S., Mossakowska M. 1985. Effect of various amino acid replacements on the conformational stability of G-actin. *Eur. J. Biochem.* 147 : 331—342.
- Turoverov K. K., Biktashev A. G., Khaitlina S. Yu., Kuznetsova I. M. 1999a. 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., Kuznetsova I. M., Khaitlina S. Yu., Uversky V. N. 1999b. Unusual combination of the distorted structure and frozen mobility in inactivated actin molecule. *Protein Peptide Lett.* 6 : 73—78.
- Turoverov K. K., Kuznetsova I. M., Zaitsev V. N. 1985. The environment of tryptophan residue in *Pseudomonas aeruginosa* azurin and its fluorescence properties. *Biophys. Chem.* 23 : 79—89.
- Turoverov K. K., Verkhusha V. V., Shavlovsky M. M., Biktashev A. G., Povarova O. I., Kuznetsova I. M. 2002. Kinetics of actin unfolding induced by guanidine hydrochloride. *Biochemistry.* 41 : 1014—1019.
- Uversky V. N., Talapatra A., Gillespie J. R., Fink A. L. 1999. Protein deposits as the molecular basis of amyloidoses. II. Localized amyloidoses and neurodegenerative disorders. *Med. Sci. Monitor.* 5 : 1238—1254.
- West J. J., Nagy B., Gergely J. 1967. Free adenosine diphosphate as an intermediary in the phosphorylation by creatine phosphate of adenosine diphosphate bound to actin. *J. Biol. Chem.* 242 : 1140—1145.
- Yamamoto Yu., Tanaka J. 1970. Spectroscopic studies on the configurational structures of ribonuclease T1. *Biochim. biophys. acta.* 207 : 522—531.

PHYSICAL-CHEMICAL PROPERTIES OF ACTIN IN DIFFERENT STRUCTURAL STATES.
NEW IDEAS ABOUT ITS FOLDING—UNFOLDING PATHWAYS*O. I. Povarova, I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov*Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg;
e-mail: kkt@mail.cytspb.rssi.ru

Results of actin folding—unfolding pathways examination and characterization of intermediate and misfolded states are summarized. Properties of microenvironments and peculiarities of location of tryptophan residues in protein are analysed in detail. This allowed to conclude that the main contribution to the bulk fluorescence of native protein is made by internal tryptophan residues Trp 340 and Trp 356, localized in hydrophobic regions, while tryptophan residues Trp 79 and Trp 86 are quenched. It has been shown that inactivated actin, previously regarded as an intermediate state between native and completely unfolded state of protein is in reality a misfolded aggregated state. The properties of actin in this state were characterized in detail. In particular, it is shown that inactivated actin is a monodisperse associate consisting of 15 monomer unit. Two earlier unknown intermediate states, which precede completely unfolding of protein macromolecule and formation of inactivated actin, were visualized. A new scheme of folding—unfolding processes was proposed. It is shown that the reason of anomalous effects, which are recorded for actin in solutions with small concentrations of GdnHCl, is a specific interaction of actin with a denaturant.

Key words: actin, protein, folding, intermediate states, kinetics of denaturation, intrinsic fluorescence of proteins, inactivated actin.
