

СТРУКТУРА И СТАБИЛЬНОСТЬ ГЛУТАМИНСВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ИЗ *Escherichia coli* И ЕГО КОМПЛЕКСА С ГЛУТАМИНОМ

© Ольга В. Степаненко,¹ И. М. Кузнецова,¹ К. К. Туроверов,¹ В. Скогнамизлио,²
М. Стаяно,² С. Д'Ауриа²

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, и ² Институт биохимии белка, Неаполь, Италия;
¹ электронный адрес: kkt@mail.cytspb.rssi.ru

В работе исследованы конформационные изменения глутаминсвязывающего белка из *Escherichia coli* (GlnBP) под действием гуанидингидрохлорида (GdnHCl) и влияние комплексообразования GlnBP с глутамином (Gln) на эти процессы. Исследования выполнены методами собственной УФ-флуоресценции белков, флуоресценции АНС, кругового дихроизма (КД) в дальней и ближней УФ-областях спектра. Интерпретация экспериментальных данных проведена с учетом результатов анализа микроокружения триптофановых и тирозиновых остатков. Это позволило объяснить незначительный вклад тирозиновых остатков в суммарную флуоресценцию нативного белка, сходство флуоресцентных характеристик GlnBP и GlnBP/Gln и необычный эффект превышения интенсивности триптофановой флуоресценции (длина волны регистрации 365 нм) при возбуждении светом с длиной волны 297 нм по сравнению с флуоресценцией при возбуждении светом с длиной волны 280 нм. Этот эффект объяснен спектральной зависимостью относительного вклада Trp 32 и Trp 220 в поглощение белка. Показано, что зависимость триптофановой флуоресценции белка от длины волны возбуждения должна приниматься в расчет при оценке вклада тирозиновых остатков в суммарную флуоресценцию белка и в принципе может быть использована при разработке подхода для разложения многокомпонентного спектра флуоресценции белков на составляющие — спектры флуоресценции отдельных триптофановых остатков. Использование параметрического представления флуоресцентных данных показало, что разворачивание как GlnBP, так и GlnBP/Gln является трехстадийным процессом ($N \rightarrow I_1 \rightarrow I_2 \rightarrow U$), хотя в случае комплекса GlnBP/Gln эти три стадии существенно перекрываются. Процесс $N \rightarrow I_1$ происходит при больших концентрациях GdnHCl для комплекса GlnBP/Gln по сравнению с GlnBP. Несмотря на сложный характер процесса разворачивания GlnBP, оно полностью обратимо.

Ключевые слова: глутаминсвязывающий белок, фолдинг белков, стабильность белков, собственная флуоресценция белков.

Принятые сокращения: GlnBP — глутаминсвязывающий белок, GlnBP/Gln — комплекс GlnBP с глутамином, GdnHCl — гуанидингидрохлорид, АНС — 1-анилинонафталин-8-сульфонат, КД — круговой дихроизм.

Вопрос о том, как белки сворачиваются в уникальное компактное, высокоорганизованное и функционально активное состояние, является одним из наиболее волнующих и сложных вопросов структурной и клеточной биологии (Kim, Baldwin, 1990; Ptitsyn, 1995; Arai, Kuwajima, 2000; Bilsel, Matthews, 2000; Dinner et al., 2000; Jaenicke, Lilie, 2000; Radford, 2000; Grantcharova et al., 2001; Plotkin, Onuchic, 2002; Dobson, 2003). В связи с возросшим интересом к болезням, которые являются результатом неправильного сворачивания и агрегации белков, в области изучения фолдинга белков за последние несколько лет сделаны значительные успехи (Wetzel, 1994; Speed et al., 1996; Harper, Lansbury, 1997; Carrel, Goopu, 1998; Fink, 1998). Большинство исследований выполнено на небольших однодоменных белках. Настоящая работа посвящена изучению процессов сворачивания и разворачивания GlnBP из *Escherichia coli*, который является мономерным белком (25 кДа), состоящим из двух глобу-

лярных доменов (называемых большим и малым) со сходной вторичной структурой (Hsiao et al., 1996). Малый домен состоит из трех α -спиралей и четырех параллельных и антипараллельных β -листов, связанных большой петлей, тогда как большой домен содержит две дополнительные α -спирали и три β -листа. Домены связаны двумя антипараллельными β -листами. Сайт связывания лиганда расположен в глубокой щели между доменами (рис. 1). GlnBP из *Escherichia coli* отвечает за первый этап процесса активного транспорта L-глутамината через цитоплазматическую мембрану. Различия в структуре свободного белка и белка в комплексе с лигандом делают GlnBP хорошим кандидатом на роль Gln-чувствительного элемента при разработке биосенсоров (Dattelbaum, Lakowicz, 2001; D'Auria, Lakowicz, 2001). Изучение частично свернутых промежуточных состояний белков представляет интерес в связи с предположением об их функциональной роли в живых клетках (Buckhova, Ptitsyn,

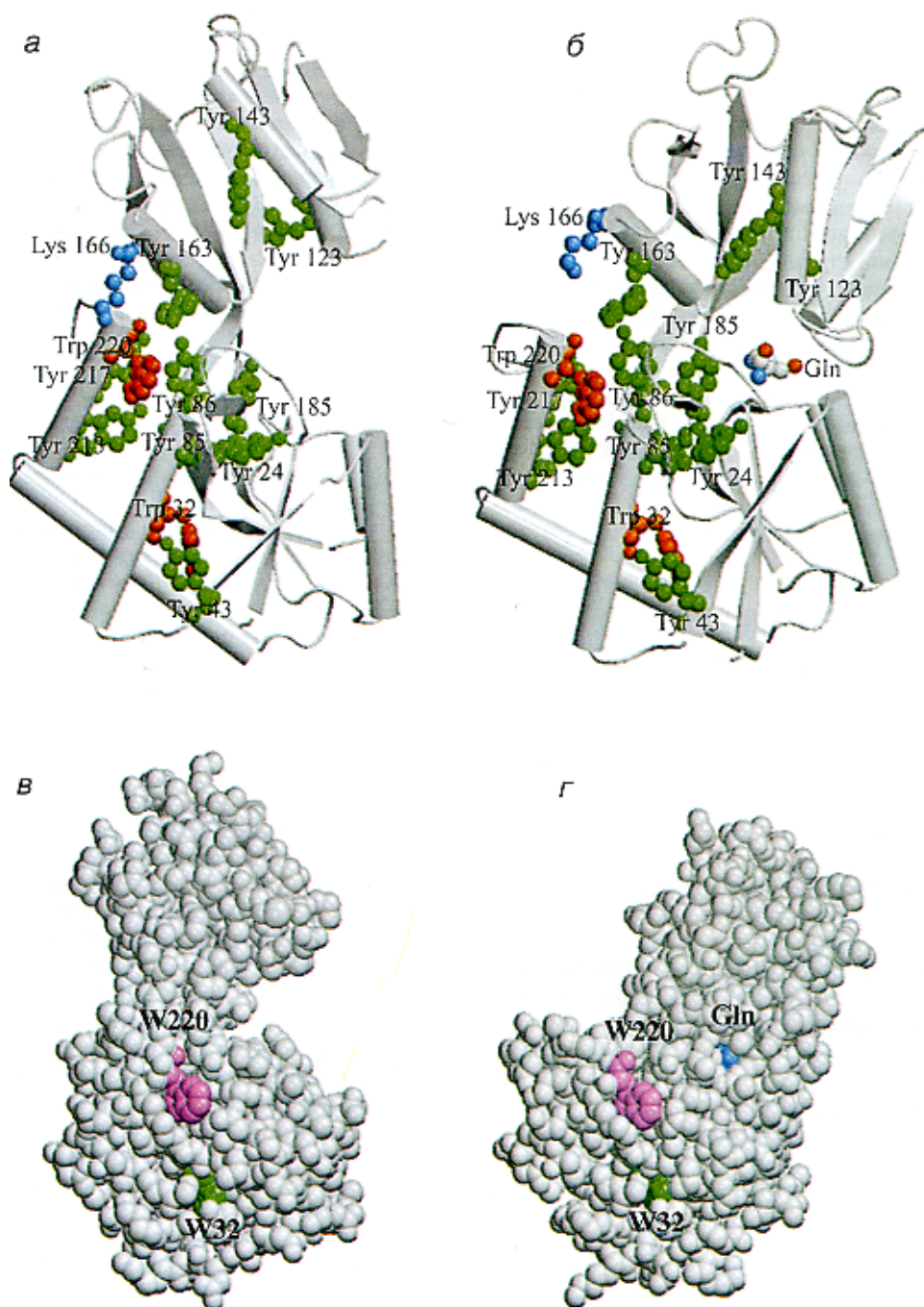


Рис. 1. Пространственная структура GlnBP (а, в) и его комплекса с Gln (б, г).

а — показаны триптофановые остатки (красным), тирозиновые остатки (зеленым); Lys 166 (синим), принадлежащий микроокружению Trp 220, и Gln (сферы). в, г — поверхности белка; Trp 32, Trp 220 и Gln показаны зеленым, красным и синим соответственно. Образование комплекса GlnBP/Gln приводит к схлопыванию макромолекулы белка вокруг Gln и к закрытию щели. Рисунок построен на основе данных Protein Data Bank (Bernstein et al., 1997), файлы 1GGG.ent (Hsiao et al., 1996) и 1WDN.ent (Sun et al., 1998). При подготовке рисунка использованы графические программы VMD (Humphrey et al., 1996) и Raster 3D (Merritt, Bacon, 1977).

суп, 1993). В частности, для GlnBP переход белка в частично свернутое денатурированное состояние лежит в основе механизма освобождения лиганда.

В работе были изучены процессы разворачивания и сворачивания GlnBP из *E. coli* в присутствии и в отсутствие лиганда под действием GdnHCl несколькими физико-химическими методами и, в частности, методом собственной флуоресценции белков. Этот метод является мощным инструментом для исследования структуры, ди-

намики и процессов сворачивания—разворачивания белков (Eftink, 1994; Эфтинк, 1998; Lakowicz, 1999; Bushmarina et al., 2001; Kuznetsova et al., 2002b; Stepanenko et al., 2004) ввиду высокой чувствительности различных параметров флуоресценции триптофановых остатков (положения спектра флуоресценции, квантового выхода, анизотропии флуоресценции и др.) к свойствам их микроокружения и особенностям локализации в макромолекуле белка. Наряду с триптофановой флуоресцен-

цией регистрировали также изменения тирозиновой флуоресценции в процессах сворачивания и разворачивания белка. Использование флуоресценции тирозиновых остатков для этих целей привлекательно тем, что тирозиновых остатков много и они равномерно распределены в молекуле белка. Интерпретация результатов флуоресцентных измерений выполнена с учетом анализа свойств микроокружения тирозиновых и триптофановых остатков в пространственной структуре GlnBP.

Наши данные показали, что, хотя есть два промежуточных частично свернутых состояния на пути разворачивания GlnBP, этот процесс обратим и ренатурация идет с образованием тех же промежуточных состояний. Кроме того, показано, что образование комплекса GlnBP с Gln приводит к существенному увеличению устойчивости GlnBP к денатурирующему воздействию GdnHCl. Действительно, переход из нативного в частично свернутое состояние I₁ для GlnBP/Gln происходит при значительно больших концентрациях GdnHCl, чем для свободного GlnBP.

Материал и методика

Очистка белка GlnBP из *E. coli* был получен и очищен согласно известной методике (Dattelbaum, Lakowicz, 2001). В работе использовали L-глутамин фирмы Sigma (США). Концентрацию белка определяли с помощью двухлучевого спектрофотометра Cary 1E фирмы Varian (США), в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (Bradford, 1976). GdnHCl (Nacalai Tesque, Япония) использовали без дополнительной очистки. Концентрацию GdnHCl определяли по коэффициенту преломления с помощью рефрактометра Abbe (ЛОМО, Россия).

Анализ пространственной структуры белка. Расположение триптофановых и тирозиновых остатков в GlnBP и комплексе GlnBP с Gln анализировали с использованием данных о координатах атомов пространственной структуры GlnBP (файл 1GGG.ent; Hsiao et al., 1996) и его комплекса с Gln (файл 1WDN.ent; Sun et al., 1998). Микроокружение триптофановых и тирозиновых остатков определяли как совокупность атомов, расположенных на расстоянии менее r_0 от геометрического центра индольного или фенольного кольца; значение r_0 было принято равным 7 Å (Turoverov et al., 1985; Кузнецова, Туроверов, 1998). Определяли атомы микроокружения, ближайшие к каждому атому индольного или фенольного кольца, и расстояние между ними. Кроме того, определяли атомы, ближайшие к ОН-группам тирозиновых остатков. Плотность упаковки атомов в микроокружении Trp и Tyr определяли как число атомов, входящих в их микроокружение, или как отношение объема, занимаемого атомами микроокружения, к общему объему сферы с радиусом 7 Å ($d = \sum V_i/V_0$). Объем, занимаемый атомами, определяли на основании известных Ван-дер-Ваальсовых радиусов атомов, причем учитывали лишь ту часть объема, которая входит в сферу радиуса 7 Å, т. е. входит в состав микроокружения. Реальный объем, занимаемый атомами, несколько меньше, так как атомы участвуют в образовании химических связей. Тем не менее для целей данного анализа это не имеет существенного значения.

Для оценки доступности триптофановых остатков для растворителя рассматривали зависимость плотности упаковки атомов как функцию удаленности от геометрического центра триптофанового остатка:

$$d(r) = \frac{\sum V_i(r, r + \Delta r)}{V_0(r, r + \Delta r)}, \quad (1)$$

где $V_0(r, r + \Delta r)$ — объем сферического слоя, который удален на расстояние r от геометрического центра индольного кольца, Δr — ширина слоя, а V_i — часть объема i -того атома, который находится внутри сферического слоя.

Эффективность безызлучательного переноса энергии рассчитывали с помощью известного соотношения (Forster, 1960)

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

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

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

Здесь θ — угол между направлениями осцилляторов излучения и поглощения молекул донора и акцептора соответственно, θ_A и θ_D — углы между направлениями соответствующих осцилляторов и вектором, соединяющим эти молекулы (Dale, Eisinger, 1974). Величина R_0 для пар Trp—Trp, Tyr—Trp и Tyr—Tyr была взята из литературы (Eisinger et al., 1969; Steinberg, 1971). Остальные величины определяли на основании координат атомов (Turoverov et al., 1985; Кузнецова, Туроверов, 1998; Turoverov, Kuznetsova, 2003). Расчет проводили в рамках модели неподвижных, строго ориентированных осцилляторов.

Флуоресцентные измерения. Все флуоресцентные измерения проводили с помощью спектрофлуориметра со стационарным возбуждением и импульсного спектрофлуориметра, предназначенного для измерения кривых затухания флуоресценции (Туроверов и др., 1998). Спектры флуоресценции измеряли при возбуждении светом с длинами волн 280 и 297 нм. Для характеристики положения спектров флуоресценции использовали параметр $A = I_{320}/I_{365}$ (I_{320} и I_{365} — интенсивности флуоресценции, измеренные при данных волн 320 и 365 нм соответственно; см.: Turoverov, Kuznetsova, 2003). Спектры флуоресценции и параметр A корректировали на спектральную чувствительность установки. Вклад тирозиновых остатков в суммарную флуоресценцию белка рассчитывали с помощью выражения

$$\Delta_{\lambda, \text{Tyr}} = \left(\frac{I_{\lambda}}{I_{365}} \right)_{280} - \left(\frac{I_{\lambda}}{I_{365}} \right)_{297}. \quad (4)$$

Анализ затухания флуоресценции. Кривые затухания флуоресценции анализировали в мультиэкспоненциальном приближении

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \exp(-t/\tau_i), \quad (5)$$

где α_i и τ_i — амплитуда и время жизни i -той компоненты,

$\sum \alpha_i = 1$. Величины α_i и τ_i определяли из уравнения свертки $I(t)$ с кривой затухания импульса лампы или образца. Расчет проводили по методу наименьших квадратов с использованием алгоритма минимизации Маркуардта (Marquardt, 1963). В качестве эталона использовали растворы *p*-терфенила в этиловом спирте или водный раствор *N*-ацетилтриптофанамида (Zuker et al., 1985). Вклад *i*-той компоненты в суммарное излучение определяли как

$$S_i = \frac{\alpha_i \int_0^{\infty} \exp(-t/\tau_i) dt}{\sum \alpha_i \int_0^{\infty} \exp(-t/\tau_i) dt} = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum \alpha_i \tau_i} \quad (6)$$

Среднеквадратичную величину времени жизни флуоресценции $\langle \tau \rangle$ для биоэкспоненциального затухания определяли из соотношения

$$\langle \tau \rangle = \frac{\alpha_1 \tau_1^2 + \alpha_2 \tau_2^2}{\alpha_1 \tau_1 + \alpha_2 \tau_2} = \sum S_i \tau_i \quad (7)$$

Результаты

В работе были изучены характеристики GlnBP и комплекса GlnBP/Gln в нативном и развернутом состояниях, измерены равновесные зависимости различных параметров собственной флуоресценции, интенсивности флуоресценции АНС и спектров КД в дальней и ближней УФ-областях спектра от концентрации GdnHCl.

На рис. 2 представлены спектры триптофановой флуоресценции GlnBP и GlnBP/Gln в нативном и развернутом (3.0 M GdnHCl) состояниях при длине волны возбуждения 297 нм. Спектр флуоресценции GlnBP в нативном состоянии имеет максимум приблизительно при 332 нм. При связывании Gln максимум флуоресценции GlnBP слегка сдвигается в коротковолновую область (на 1—2 нм). Как и ожидалось, разворачивание белка под действием 3.0 M GdnHCl сопровождается существенным длинноволновым сдвигом спектра флуоресценции. Спектры флуоресценции GlnBP и GlnBP/Gln в 3.0 M GdnHCl совпадают (их максимум — 353 нм). Интенсивность флуоресценции развернутого белка существенно меньше, чем нативного.

На рис. 3 показаны кривые затухания флуоресценции нативного и развернутого GlnBP. Обнаружено, что для GlnBP/Gln эти кривые практически такие же, как и для GlnBP (данные не представлены). В табл. 1 показаны средние времена жизни возбужденных состояний GlnBP и GlnBP/Gln при разных концентрациях GdnHCl.

На рис. 4, а показан вклад тирозиновых остатков в суммарную флуоресценцию нативного и развернутого GlnBP. Спектр флуоресценции нативного белка, полученный при длине волны возбуждения 280 нм, только слегка отличается от спектра, полученного при длине волны возбуждения 297 нм. Этот результат указывает на незначительный вклад тирозиновых остатков в суммарную флуоресценцию нативного белка. С другой стороны, очевидно, что существует значительный вклад тирозиновых остатков в суммарную флуоресценцию развернутого белка. На рис. 4, б показано изменение вклада

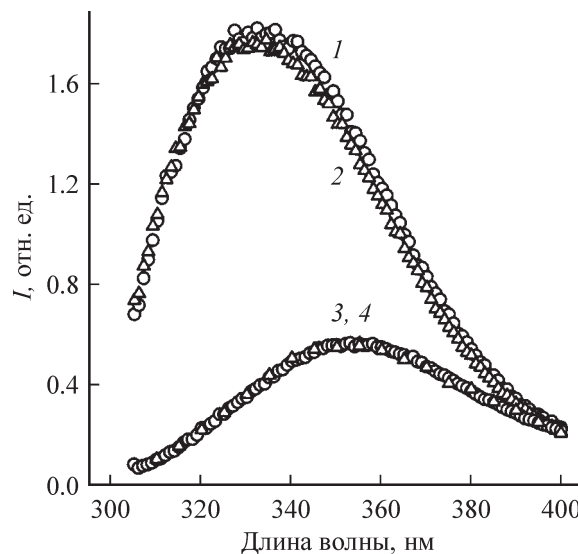


Рис. 2. Спектры флуоресценции GlnBP (кривые 1, 3) и его комплекса с Gln (кривые 2, 4) в нативном (кривые 1, 2) и развернутом (кривые 3, 4) состояниях.

Белок был денатурирован 3.0 M GdnHCl. $\lambda_{\text{возб.}} = 297$ нм. Все величины приведены к интенсивности флуоресценции нативного GlnBP при 365 нм.

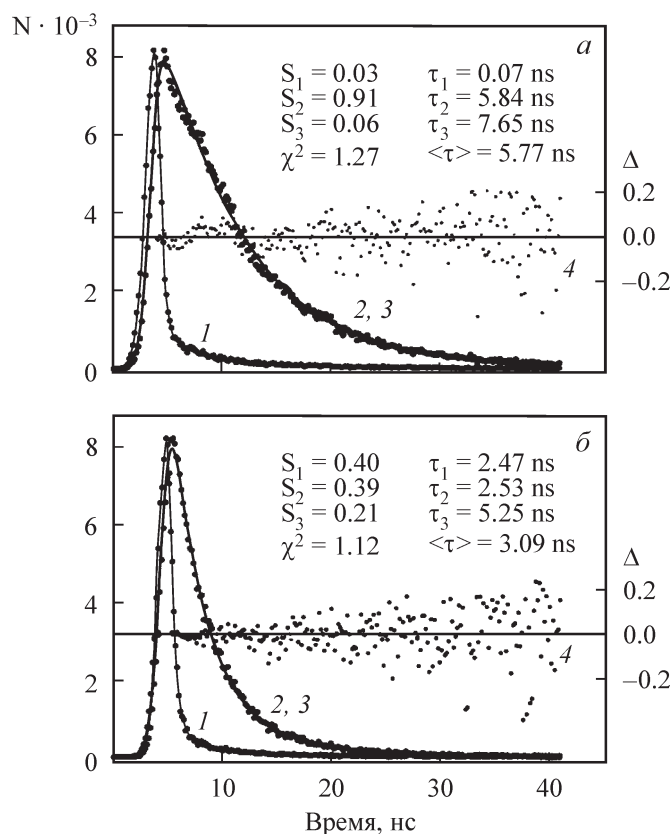


Рис. 3. Кривые затухания триптофановой флуоресценции нативного (а) и развернутого (б) GlnBP.

Кривая 1 — временной профиль импульса возбуждающего света; кривая 2 — экспериментальная кривая затухания флуоресценции; кривые 3, 4 — расчетная кривая затухания, наилучшим образом отвечающая экспериментальным данным, и взвешенные отклонения. Длина волны возбуждения 297 нм, длина волны регистрации 340 нм. Показаны величины τ_i , S_i , χ^2 и среднего времени жизни $\langle \tau \rangle$.

Таблица 1

Времена жизни возбужденного состояния GlnBP и GlnBP/Gln при разных концентрациях GdnHCl

Концентрация GdnHCl, М	$\langle \tau \rangle$, нс	
	GlnBP	GlnBP/Gln
0.0	5.77—5.85	5.78—5.59
0.5—1.3	4.18—4.26	5.71—5.59
3.0	3.00—3.07	3.08—3.12

тирозиновых остатков в суммарную флуоресценцию GlnBP и GlnBP/Gln при увеличении концентрации GdnHCl. Увеличение вклада тирозиновых остатков в спектр флуоресценции начинается при 0.2 М GdnHCl для GlnBP; для GlnBP/Gln вклад тирозиновых остатков остается постоянным до 0.8 М GdnHCl. При 1.4 М GdnHCl начинается вторая стадия увеличения вклада тирозиновых остатков.

Изменения нескольких параметров триптофановой флуоресценции GlnBP и GlnBP/Gln в зависимости от концентрации GdnHCl представлены на рис. 5. Зависимость интенсивности триптофановой флуоресценции GlnBP, измеренной при 320 нм (рис. 5, а), позволяет предполагать существование по крайней мере двух переходов. Первый переход лежит в области концентраций 0.2—0.7 М GdnHCl, а второй — в области 1.4—2.1 М GdnHCl. Эти же два перехода были обнаружены на пути сворачивания белка. Величины интенсивности флуоресценции, измеренные на пути разворачивания и сворачивания, совпадают. В противоположность GlnBP кривая изменения флуоресценции GlnBP/Gln под действием GdnHCl соответствует модели перехода «все или ничего», который начинается при 1.3 М GdnHCl и заканчивается при 2.1 М GdnHCl.

На рис. 5, б представлена зависимость интенсивности триптофановой флуоресценции GlnBP от концентрации GdnHCl, измеренная при длине волны регистрации 365 нм. В отличие от аналогичной зависимости, измеренной при длине волны регистрации 320 нм, наблюдается выраженное увеличение интенсивности флуоресценции в области концентраций GdnHCl 0.7—1.4 М, что свидетельствует о сложном характере процесса разворачивания.

На рис. 5, в показана зависимость параметра A (I_{320}/I_{365}), характеризующего положение спектра флуоресценции GlnBP и GlnBP/Gln, от концентрации GdnHCl. Разворачивание белка сопровождается существенным длинноволновым сдвигом спектра флуоресценции, т. е. уменьшением параметра A . Как и в случае зависимости интенсивности флуоресценции при 320 нм, характер зависимости параметра A от концентрации GdnHCl для GlnBP свидетельствует о существовании по крайней мере двух переходов. Первый переход лежит в области концентраций GdnHCl 0.2—0.7 М, а второй — в области концентраций GdnHCl 1.4—2.1 М. Кривые ренатурации белка совпадают с кривыми разворачивания белка. Для GlnBP/Gln кривая изменения параметра A под действием GdnHCl соответствует модели перехода «все или ничего». Переход начинается при 1.3 М GdnHCl и заканчивается при 2.1 М GdnHCl.

Зависимость кругового дихроизма (КД) в дальней УФ-области спектра для GlnBP, так же как и зависимости величины I_{320} и параметра A от концентрации GdnHCl, свидетельствует о существовании по крайней мере двух переходов в области концентраций GdnHCl 0.2—0.7 и 1.4—2.1 М (рис. 5, г). В противоположность GlnBP кривая изменения КД в дальней УФ-области для GlnBP/Gln под действием GdnHCl соответствует модели перехода «все или ничего», который начинается при 1.3 М GdnHCl и заканчивается при 2.1 М GdnHCl. Изменения спектра КД в ближней УФ-области спектра под воздействием GdnHCl представлены на рис. 6.

На рис. 5, д показано изменение анизотропии флуоресценции GlnBP и GlnBP/Gln в зависимости от концентрации GdnHCl. В отличие от аналогичных зависимостей интенсивности флуоресценции и положения спектра флуоресценции зависимости анизотропии флуоресценции GlnBP и GlnBP/Gln совпадают на всем промежутке концентраций GdnHCl от 0.0 до 3.0 М. Величина анизотропии флуоресценции остается постоянной до 1.3—1.4 М GdnHCl как для GlnBP, так и для GlnBP/Gln. В области концентраций GdnHCl 1.4—2.0 М анизотропия флуоресценции резко уменьшается, достигая вели-

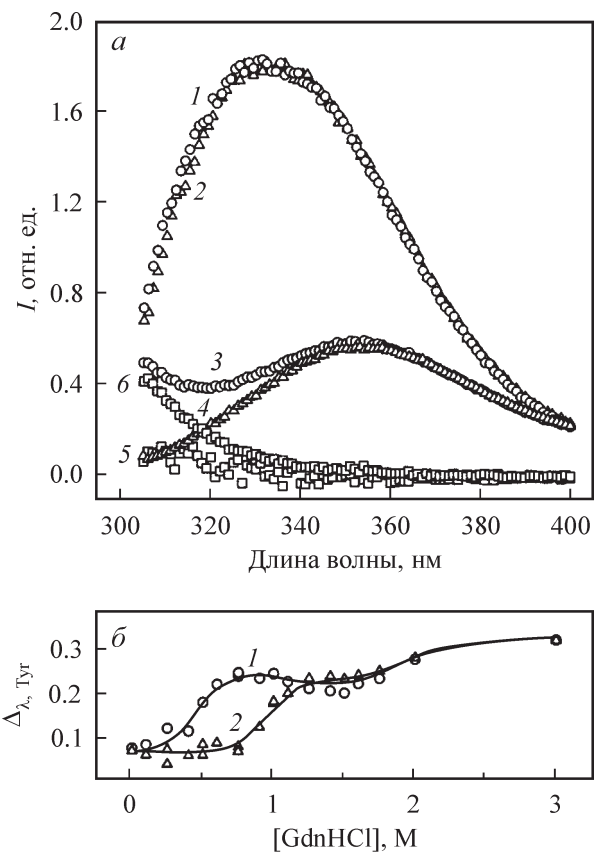


Рис. 4. Вклад тирозиновых остатков в суммарную флуоресценцию нативного и развернутого GlnBP.

а — спектры флуоресценции нативного (1, 2) и развернутого (3, 4) GlnBP при длинах волн возбуждения 280 (1, 3) и 297 (2, 4) нм. Кривые 1, 2 приведены к единице при 365 нм; кривые 3, 4 приведены к интенсивности флуоресценции нативного белка при длине волны возбуждения 297 нм. 5, 6 — разница между кривыми 1, 2 и 3, 4 соответственно. б — изменение вклада тирозиновых остатков, измеренного при 320 нм ($\Delta\lambda_{\text{Tyr}}$), в зависимости от концентрации GdnHCl для GlnBP (кривая 1) и GlnBP/Gln (кривая 2).

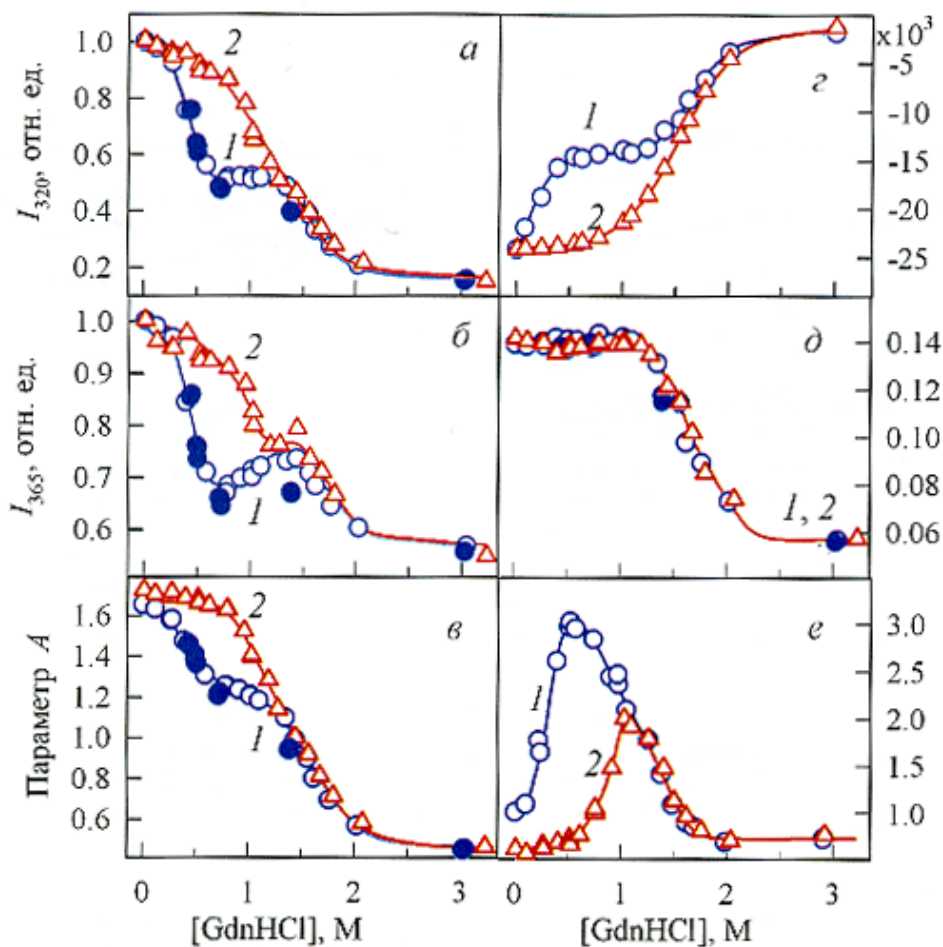


Рис. 5. Конформационные переходы GlnBP (кривые 1) и его комплекса с Gln (кривые 2) под действием GdnHCl.

a — изменение интенсивности флуоресценции при длине волны регистрации 320 нм, $\lambda_{\text{возб.}} = 297$ нм; *б* — изменение интенсивности флуоресценции при длине волны регистрации 365 нм, $\lambda_{\text{возб.}} = 297$ нм; *в* — изменение параметра $A = I_{320} / I_{365}$, $\lambda_{\text{возб.}} = 297$ нм; *г* — изменение эллиптичности при 222 нм; *д* — изменение анизотропии флуоресценции, $\lambda_{\text{возб.}} = 297$ нм, $\lambda_{\text{рег.}} = 365$ нм; *е* — изменение интенсивности флуоресценции АНС, $\lambda_{\text{возб.}} = 365$ нм, $\lambda_{\text{рег.}} = 480$ нм. Светлые символы — разворачивание, темные — сворачивание.

чины, характерной для развернутого белка при 3.0 М GdnHCl.

Флуоресценцию АНС, добавленного к растворам GlnBP и GlnBP/Gln, содержащим разные концентрации GdnHCl, измеряли при длине волны регистрации 480 нм ($\lambda_{\text{возб.}} = 365$ нм; рис. 5, *e*). Как для GlnBP, так и для GlnBP/Gln эти зависимости имеют колоколообразную форму. Величина интенсивности флуоресценции АНС в растворах нативного (в присутствии 0.0 М GdnHCl) и полностью развернутого (в присутствии 3.0 М GdnHCl) белка очень низка и практически равна величине интенсивности флуоресценции свободного АНС при тех же условиях. Для GlnBP увеличение интенсивности флуоресценции АНС начинается при очень небольших концентрациях GdnHCl (0.1 М), достигает максимума приблизительно при 0.5 М GdnHCl, после чего уменьшается, выходя на плато при 1.6 М GdnHCl. Для GlnBP/Gln начало увеличения интенсивности и максимум флуоресценции АНС сдвинуты к большим концентрациям GdnHCl (0.5 и 1.2 М соответственно). Часть кривой, соответствующей снижению интенсивности флуоресценции АНС, совпадает с аналогичной частью кривой для GlnBP.

Кинетические кривые сворачивания GlnBP и комплекса GlnBP/Gln под действием разных концентраций GdnHCl, измеренные по изменению интенсивности флу-

оресценции при 320 нм, представлены на рис. 7. На рис. 7 также показаны равновесные значения интенсивности флуоресценции GlnBP и комплекса GlnBP/Gln, достигаемые за первые 10 мин. Комплекс GlnBP/Gln разворачивается медленнее, чем GlnBP.

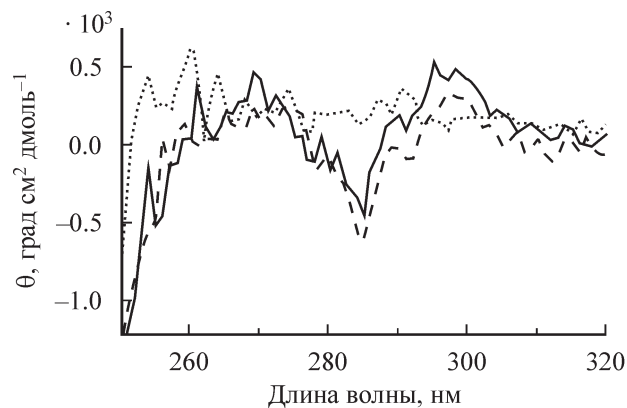


Рис. 6. Спектры кругового дихроизма GlnBP в ближней УФ-области спектра.

Сплошная, штриховая линии и точки — кривые, соответствующие концентрациям 0.0, 0.75 и 3.0 М GdnHCl соответственно.

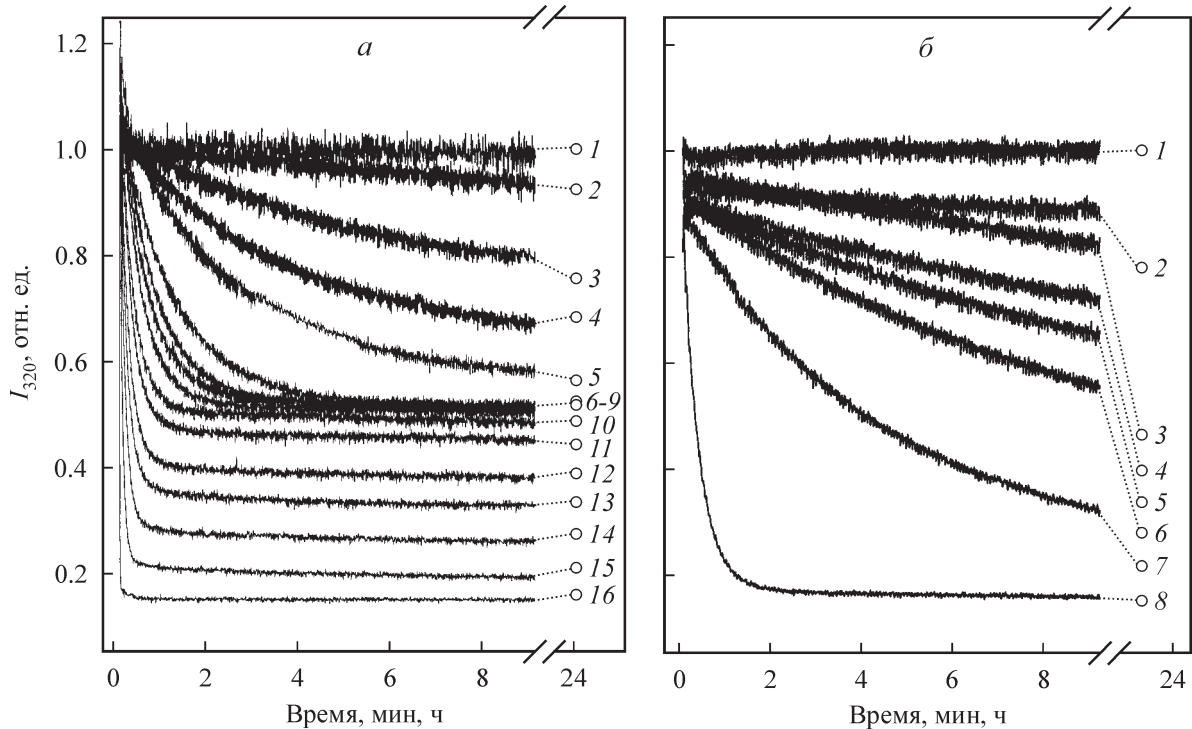


Рис. 7. Кинетические кривые разворачивания GlnBP в отсутствие (а) и в присутствии (б) Gln под действием GdnHCl.

а — кривые 1–16 соответствуют конечным концентрациям 0.0, 0.26, 0.39, 0.49, 0.58, 0.79, 0.91, 1.01, 1.09, 1.34, 1.43, 1.55, 1.61, 1.76, 2.02 и 3.04 М GdnHCl соответственно; б — кривые 1–8 соответствуют конечным концентрациям 0.0, 0.95, 1.43, 1.56, 1.67, 1.79, 2.07 и 3.23 М GdnHCl соответственно. $\lambda_{\text{возб.}} = 297$ нм.

Обсуждение

Для изучения процессов сворачивания и разворачивания GlnBP и его комплекса GlnBP/Gln были измерены равновесные зависимости собственной флуоресценции, интенсивности флуоресценции АНС, КД в дальней и ближней УФ-областях спектра от концентрации GdnHCl. Данные, полученные методом собственной флуоресценции, анализировали с учетом свойств микроокружения и особенностей локализации триптофановых и тирозиновых остатков в белке (Kuznetsova et al., 2004).

Тр-флуоресценция GlnBP и его комплекса с Gln в нативном и полностью развернутом состояниях. На рис. 2 представлены спектры триптофановой флуоресценции GlnBP и GlnBP/Gln в нативном и развернутом (3.0–6.0 М GdnHCl) состояниях при длине волны возбуждения 297 нм. Поскольку поглощение тирозиновых остатков на длинноволновом краю спектра поглощения незначительно, флуоресценция при возбуждении светом с длиной волны 297 нм определяется исключительно триптофановыми остатками (Lakowicz, 1999). Спектр флуоресценции GlnBP в нативном состоянии представляет собой широкую бесструктурную полосу с максимумом при 332 нм. При связывании Gln максимум флуоресценции слегка сдвигается в коротковолновую область (на 1–2 нм). Эти данные отличаются от данных, полученных в работе Вейнера и Хеппеля (Weiner, Herpel, 1971), в которой сообщается о максимуме спектра флуоресценции при 336 нм (возбуждение при 280 нм), но хорошо согласуются с данными Акселсена и сотрудников (Axelsen et al., 1991), которые зарегистрировали максимум флуоресценции при 330 нм (возбуждение при 295 нм). Как и ожидалось, разворачивание белка

под действием 3.0–6.0 М GdnHCl сопровождается существенным длинноволновым сдвигом спектра флуоресценции. Спектры флуоресценции GlnBP и GlnBP/Gln в 3.0–6.0 М GdnHCl совпадают и имеют максимум при длине волны 353 нм.

Интенсивность флуоресценции развернутого белка существенно ниже, чем нативного, что неудивительно, поскольку квантовый выход триптофановых остатков, доступных для растворителя, обычно ниже квантового выхода триптофановых остатков, локализованных во внутренних областях молекулы. Кривые затухания флуоресценции хорошо аппроксимируются трехэкспоненциальным приближением. Среднеквадратичное время затухания флуоресценции составляет 5.77 для нативного и 3.09 нс для развернутого белка (рис. 3). Синхронное уменьшение времени жизни флуоресценции (рис. 3) и интенсивности триптофановой флуоресценции (рис. 2) под действием GdnHCl свидетельствует об увеличении динамического тушения флуоресценции при разворачивании белка. Согласно данным Акселсена с сотрудниками (Axelsen et al., 1991), кривые затухания флуоресценции описываются двухэкспоненциальной моделью со средним временем жизни 5.93 нс. Так как основная компонента затухания составляет более 90 % как по данным этих авторов, так и по нашим, можно сделать заключение о хорошем совпадении результатов этих работ. Время жизни флуоресценции для белка в развернутом состоянии (3.09 нс) хорошо согласуется со значениями, полученными для других белков в развернутом состоянии (Grinvald, Steinberg, 1976).

Микроокружение триптофановых остатков GlnBP. Для того чтобы оценить вклад отдельных триптофановых остатков в суммарную флуоресценцию

белка, был выполнен анализ пространственной структуры GlnBP (файл 1GGG.ent; Hsiao et al., 1996) и его комплекса с Gln (файл 1WND.ent; Sun et al., 1998). Анализ показал, что оба триптофановых остатка GlnBP (Trp 32 и Trp 220) расположены в большом домене (рис. 1) далеко от сайта связывания лиганда, Trp 32 принадлежит первой α -спирали Phe 27—Glu 38, а Trp 220 — последней α -спирали Thr 212—Phe 221.

Триптофановые остатки расположены далеко друг от друга ($R = 16 \text{ \AA}$), и эффективность переноса энергии между ними незначительна, что противоречит одному из выводов работы Акселсена и сотрудников (Axelsen et al., 1991) о существовании взаимодействия между триптофановыми остатками в GlnBP.

Плотность микроокружения обоих триптофановых остатков не очень высока (63 и 66 атомов в микроокружениях Trp 32 и Trp 220 соответственно), и оба триптофановых остатка практически доступны для растворителя (Axelsen et al., 1991). Однако анализ пространственной структуры показывает, что Trp 32 в несколько большей степени погружен во внутренние области белка, чем Trp 220 (рис. 1, б). В то же время полярность их микроокружения различается существенно. В микроокружении Trp 32 находится много гидрофобных групп (Leu 5, Val 7, Ile 35, Ala 36, Leu 39, Leu 41, кольцо Tyr 43, Leu 45, Leu 64, Leu 66, Ile 187 и Val 200) и только одна полярная группа (ОН-группа Tyr 43). В микроокружении Trp 220 есть шесть гетероатомов полярных групп боковых цепей аминокислотных остатков (атомы OD1 и OD2 остатка Asp 30, атом ОН остатка Tyr 163, атомы NZ остатков Lys 166 и Lys 219), атом О связанной воды 313 и только семь неполярных групп (Pro 15, Phe 18, Val 25, Phe 27, Tyr 163, Ile 216 и Phe 221), что значительно меньше, чем у Trp 32. Таким образом, на основании анализа микроокружения триптофановых остатков можно сделать вывод о том, что Trp 220 должен иметь более длинноволновый спектр, чем Trp 32, что согласуется с выводами вышеупомянутых авторов (Axelsen et al., 1991).

Однако результаты анализа микроокружения Trp 32 не дают оснований для вывода о том, что этот остаток имеет столь коротковолновое положение спектра флуоресценции и столь низкий квантовый выход, как это указано в работе Акселсена с сотрудниками (Axelsen et al., 1991) для мутантных форм Trp220Tyr ($\lambda_{\text{макс.}} = 316 \text{ нм}$; квантовый выход 0.024) и Trp220Phe ($\lambda_{\text{макс.}} = 326 \text{ нм}$; квантовый выход 0.043). В то же время сами авторы этой работы обращают внимание на то, что спектры флуоресценции мутантных форм Trp220Tyr и Trp220Phe различаются существенно, что указывает на возможные ошибки при сайт-специфических мутациях по триптофановым остаткам. Как отмечают сами авторы (Axelsen et al., 1991), такие ошибки могут возникнуть вследствие того, что не существует структурно и фотофизически консервативной замены для триптофановых остатков. Кроме того, несмотря на разницу в положении спектров флуоресценции и квантовых выходов, в работе приводятся практически одинаковые бимолекулярные константы тушения (k_q) для Trp 32 и Trp 220, и это противоречие никак не объясняется (Axelsen et al., 1991). Заключение о практически одинаковых бимолекулярных константах тушения не согласуется также с результатами нашего анализа пространственной структуры GlnBP (рис. 1, б).

Флуоресценция и микроокружение триптофановых остатков в комплексе GlnBP с

Gln. Как отмечалось выше, несмотря на существенное изменение структуры GlnBP, при образовании комплекса с Gln это вызывает лишь небольшой (1—2 нм) коротковолновый сдвиг спектра флуоресценции (рис. 2). Чтобы объяснить причины таких небольших изменений, мы выполнили сравнительный анализ микроокружения триптофановых остатков GlnBP и его комплекса с Gln. Связывание L-глутамин вызывает закрытие щели и существенные структурные изменения с образованием так называемой закрытой формы (рис. 1, файл 1WND.ent; Sun, 1998), а также существенные изменения внутримолекулярной подвижности белка (Pang et al., 2003). Тем не менее связывание Gln вызывает лишь незначительные изменения микроокружения Trp 32 и Trp 220. Для GlnBP/Gln в состав микроокружения обоих триптофановых остатков входит по 65 атомов. Как говорилось выше, в микроокружении Trp 32 есть только одна полярная группа — это ОН-группа Tyr 43. Положение этой группы лишь слегка изменяется при формировании комплекса GlnBP/Gln. Хотя число атомов в микроокружении Trp 220 практически одинаково для белка в отсутствие лиганда и для белка, связанного с лигандом, их состав претерпевает некоторые изменения. В микроокружении Trp 220 GlnBP входят Pro 15, Phe 18, Phe 27, Phe 221 и Tyr 163, тогда как для GlnBP/Gln в микроокружении остаются только Pro 15, Phe 18 и Phe 27. Аминокислотные остатки Phe 221 и Tyr 163, принадлежащие другому домену, уходят из микроокружения Trp 220 при образовании комплекса. Интересно, что в отсутствие лиганда в микроокружении Trp 220 больше гетероатомов боковых цепей и связанной воды (шесть), чем в комплексе с Gln (четыре). При образовании комплекса ОН-группа Tyr 163 и атом N2 Lys 166 уходят из микроокружения Trp 220, тогда как ориентация и расстояние до центра триптофанового остатка для других групп меняются незначительно (рис. 1). Таким образом, становится понятным, почему связывание лиганда лишь незначительно влияет на спектр триптофановой флуоресценции GlnBP (рис. 2).

Тирозиновая флуоресценция GlnBP. Обычно изучение структурных превращений белков методом собственной флуоресценции предполагает использование флуоресценции их триптофановых остатков. Причиной этого является высокая чувствительность характеристик триптофановой флуоресценции к свойствам их микроокружения и как следствие — ко всем структурным изменениям белка. Однако при этом существует риск регистрации локальных структурных изменений вблизи триптофановых остатков. Вот почему наряду с использованием триптофановой флуоресценции может быть полезно измерение тирозиновой флуоресценции. Обычно в белках число тирозиновых остатков значительно превышает число триптофановых остатков. Так, GlnBP содержит два триптофановых и десять тирозиновых остатков; четыре тирозиновых остатка локализованы в малом домене, а другие шесть — в большом домене (рис. 1).

Положение спектра флуоресценции тирозиновых остатков практически не зависит от их микроокружения. В белках, содержащих триптофановые остатки, единственной характеристикой тирозиновой флуоресценции, которая может оказаться полезной при исследовании структурных изменений белка, является вклад тирозиновых остатков в его суммарную флуоресценцию. Преимущество использования флуоресценции тирози-

Таблица 2

Эффективность безызлучательного переноса энергии от тирозиновых остатков к триптофановым для GlnBP и комплекса GlnBP/Gln

Tyr	Trp 32		Trp 220	
	GlnBP	GlnBP/Gln	GlnBP	GlnBP/Gln
24	0.89	0.91	0.83	0.78
43	0.96	1.00	0.88	0.89
85	0.95	0.91	0.43	0.31
86	0.86	0.86	0.94	0.96
123	0.00	0.00	0.05	0.00
143	0.02	0.02	0.56	0.73
163	0.42	0.36	1.00	1.00
185	0.89	0.90	0.91	0.92
213	0.40	0.34	0.76	0.70
217	0.29	0.28	0.99	0.99

Примечание. Здесь и в табл. 3 для расчета эффективности безызлучательного переноса энергии и в табл. 4 для характеристики микроокружения тирозиновых остатков использовали рентгеноструктурные данные Банка белковых структур (Bernstein et al., 1977), файлы 1GGG.ent (Hsiao et al., 1996) и 1WDN.ent (Sun et al., 1998). Полужирным шрифтом выделены результаты расчета для Tyr 123 — единственного тирозинового остатка, не передающего энергию возбуждения на Trp 32 и Trp 220.

новых остатков состоит в том, что они расположены достаточно равномерно по всей макромолекуле белка, и есть шанс обнаружить структурные переходы, не регистрируемые при использовании триптофановой флуоресценции.

Обычно вклад тирозиновых остатков в суммарную флуоресценцию белка рассчитывается из сравнения спектров флуоресценции, измеренных при возбуждении светом с длинами волн 280 и 295—297 нм, так как считается, что тирозиновые остатки не поглощают в длинно-

волновой области спектра. На рис. 4 показан результат такого расчета для GlnBP в нативном и полностью развернутом состояниях. Очевидно, что хотя GlnBP содержит 10 тирозиновых остатков, их вклад в суммарную флуоресценцию нативного GlnBP незначителен. Анализ микроокружения тирозиновых остатков показал, что есть две причины низкого квантового выхода тирозиновых остатков GlnBP. Во-первых, существуют условия для эффективного переноса энергии от большинства тирозиновых остатков к триптофановым. Все тирозиновые остатки, кроме Tyr 123, могут эффективно передавать энергию возбуждения прямо на Trp 32 и (или) Trp 220 (табл. 2) или через другие тирозиновые остатки (табл. 3). Во-вторых, большинство тирозиновых остатков может быть загашено не только переносом энергии на триптофановые остатки, но также близлежащими тушащими группами или переносом энергии на тирозиновые остатки, которые загашены (табл. 4). В то же время интенсивность тирозиновой флуоресценции существенно возрастает при денатурации белка в 3.0—6.0 М GdnHCl (рис. 4). Таким образом, изменение вклада тирозиновых остатков в суммарную флуоресценцию белка можно рассматривать в качестве характеристики, которую можно использовать для наблюдения процесса разворачивания белка.

Зависимость триптофановой флуоресценции GlnBP от длины волны возбуждения. Для того чтобы проверить существование эффективного переноса энергии от тирозиновых остатков к триптофановым, мы измерили зависимость интенсивности флуоресценции при 365 нм (триптофановой флуоресценции) от концентрации GdnHCl при двух длинах волн возбуждения — 280 и 297 нм (рис. 8). Величина интенсивности флуоресценции нативного белка при возбуждении светом с длиной волны 297 нм была принята за единицу, величины интенсивности флуоресценции развернутого белка при возбуждении светом с длиной волны 280 нм и 297 нм были приравнены. Следует отметить, что мы можем приравнять эти величины, так как разворачивание белка приводит к потере условий для переноса энергии от тирозиновых остатков к триптофановым и нивелирует

Таблица 3

Эффективность переноса энергии между тирозиновыми остатками GlnBP

Tyr/Tyr	24	43	85	86	123	143	163	185	213	217
24		12.8	16.39	18.13	33.04	23.94	14.85	16.83	21.00	20.58
43	0.59		14.63	20.03	37.34	32.95	22.40	19.34	18.23	21.53
85	0	0		7.05	23.25	23.61	16.11	6.36	7.95	10.57
86	0.01	0	0.49		18.16	17.51	11.58	5.15	7.95	5.63
123	0	0	0.02	0		17.96	23.57	18.08	23.97	20.47
143	0	0	0.02	0.29	0.04		11.86	18.50	24.34	18.61
163	0.08	0.02	0	0.78	0	0.72		13.78	16.32	11.63
185	0.06	0	0.97	0.99	0.09	0.26	0.36		11.57	10.76
213	0.01	0.03	0.89	0.95	0	0.05	0.18	0.58		6.24
217	0.06	0.06	0.28	0.99	0	0.15	0.58	0.36	0.01	

Примечание. Показаны величины эффективности безызлучательного переноса энергии W (нижняя левая часть таблицы) и расстояния R между геометрическими центрами фенольных колец тирозиновых остатков (верхняя правая часть таблицы), Å. Полужирным шрифтом выделены значения W и R для тех пар тирозиновых остатков, для которых величина W больше 0.15.

Таблица 4

Характеристика микроокружения тирозиновых остатков GlnBP

Тур	N	Потенциальные тушители тирозиновой флуоресценции	R, Å	Атомы кислорода связанной воды			
				N _{НОН}	R _{ОН} , Å		
24	52	O Thr 11	3.1	317	5.3		
		OG1 Thr 11	5.6				
43	46	NE1 Thr 32	4.2				
85	83	OD1 Asp 28	2.9			225	3.1
		OD2 Asp 28	3.6				
86	68	OH Tyr 217	3.8				
123	35	OD2 Asn 127	3.6				
143	61	OD2 His 156	3.9			281	2.7
163	47	OG1 Thr 167	5.6				
185	56	OG Ser 88	3.7			332	3.1
213	64	O Tyr 85	2.7				
		N Tyr 85	3.5				
217	66	OH Tyr 86	3.8				
		OXT Glu 224	4.5				

Примечание. N — число атомов в микроокружении атома кислорода гидроксильной группы тирозинового остатка; N_{НОН} — номер молекулы связанной воды; R — расстояние от атома О или N остатков — потенциальных тушителей тирозиновой флуоресценции — до центра фенольного кольца соответствующего тирозинового остатка; Å; R_{ОН} — расстояние от атома кислорода гидроксильной группы тирозинового остатка до атома кислорода связанной воды.

все особенности микроокружения отдельных триптофановых и тирозиновых остатков.

Можно было ожидать, что для нативного белка мы получим $(I_{280}/I_{297})_{365} > 1$, если при возбуждении светом с длиной волны 280 нм энергия возбужденных триптофановых остатков определяется поглощением самих триптофановых остатков и переносом энергии от тирозиновых остатков (Тур → Трп). Это отношение может быть равным единице, если нет переноса энергии от тирозиновых к триптофановым остаткам. Однако экспериментально было обнаружено, что $(I_{280}/I_{297})_{365} < 1$. Такое соотношение может иметь место только в случае изменения спектра поглощения, вызванного разворачиванием белка, которое может вызывать уменьшение величины $(I_{280}/I_{297})_{365}$, если для коэффициента молярной экстинкции ϵ справедливо соотношение $(\epsilon_{280}/\epsilon_{297})_N < (\epsilon_{280}/\epsilon_{297})_U$. Изменение формы спектра поглощения при разворачивании белка должно быть значительным, для того чтобы превзойти эффект переноса энергии Тур → Трп, который, напротив, приводит к превышению I_{280} над I_{297} .

Наше объяснение полученного соотношения $(I_{280}/I_{297})_{365} < 1$ основывается на данных работы Акселсена с сотрудниками (Axelsen et al., 1991), в которой было показано достоверное различие спектров второй производной поглощения GlnBP дикого типа и четырех мутантных форм GlnBP по одному из триптофановых остатков. Спектры второй производной поглощения свидетельствуют о наличии небольшого плеча в спектрах поглощения (т. е. отрицательной второй производной) при 293 нм для ди-

кого типа и мутантных форм с заменой Трп 220 на тирозиновый или фенилаланиновый остаток. Таким образом, было показано, что за плечо в спектре поглощения ответствен Трп 32 (Axelsen et al., 1991).

Это плечо в длинноволновой области спектра поглощения GlnBP было надежно зарегистрировано и в наших экспериментах (рис. 9, а). Согласно нашим данным, Трп 220 дает основной вклад на длинноволновом участке спектра поглощения GlnBP. Этот вывод сделан на основании зависимости параметра A от длины волны возбуждения (рис. 9, б). Как было показано выше, тирозиновые остатки дают незначительный вклад в спектр флуоресценции нативного GlnBP. Вследствие этого зависимость параметра A от длины волны возбуждения может определяться только изменением относительного вклада Трп 32 и Трп 220 в суммарную флуоресценцию белка. Характер этой зависимости позволяет предполагать, что вклад Трп с более длинноволновым положением спектра флуоресценции возрастает с увеличением длины волны. На рис. 9, в представлены спектры флуоресценции нативного GlnBP при возбуждении на 297 и 280 нм, которые построены с учетом определенного соотношения $(I_{280}/I_{297})_{365} = 0.93$ (см. рис. 8), а также разностный спектр $I_{297}(\lambda) - I_{280}(\lambda)$:

$$\Delta I(\lambda) = I_{297}(\lambda) - I_{280}(\lambda) = \Delta I_{297}(\Delta \epsilon \text{ Трп 220}) - \Delta I_{280}(\text{Тур} \rightarrow \text{Трп 220}) - \Delta I_{280}(\text{Тур} \rightarrow \text{Трп 32}). \quad (8)$$

Величина $\Delta I(\lambda)$ представляет собой ту часть флуоресценции Трп 220, которая определяется превышением поглощения этого остатка на длинноволновом краю спектра поглощения $\Delta I_{297}(\Delta \epsilon \text{ Трп 220})$. В выражении (8) величины $\Delta I_{280}(\text{Тур} \rightarrow \text{Трп 220})$ и $\Delta I_{280}(\text{Тур} \rightarrow \text{Трп 32})$ представляют собой части флуоресценции Трп 220 и Трп 32, которые определяются их переходом в возбужденное состояние при переносе энергии от тирозиновых остатков при возбуждении светом с длиной волны 280 нм.

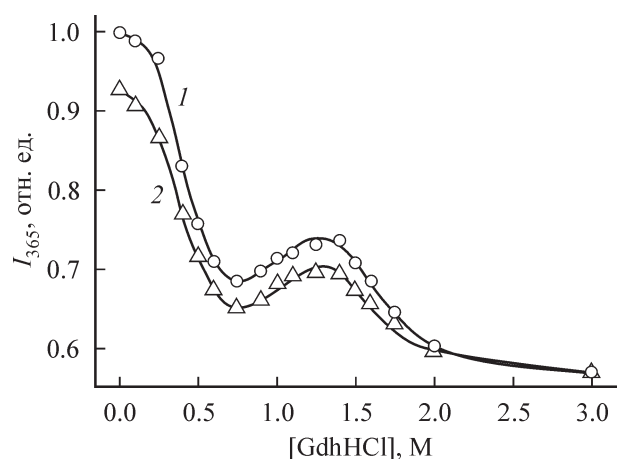


Рис. 8. Изменение интенсивности триптофановой флуоресценции ($\lambda_{\text{пер.}} = 365$ нм) GlnBP при возбуждении светом с длинами волн 297 (1) и 280 (2) нм в процессе разворачивания белка под действием GdnHCl.

Все величины нормированы на величину интенсивности флуоресценции нативного белка при длине волны возбуждения 297 нм, величина интенсивности флуоресценции развернутого белка при возбуждении светом с длиной волны 280 нм была приравнена к величине интенсивности флуоресценции развернутого белка при возбуждении светом с длиной волны 297 нм.

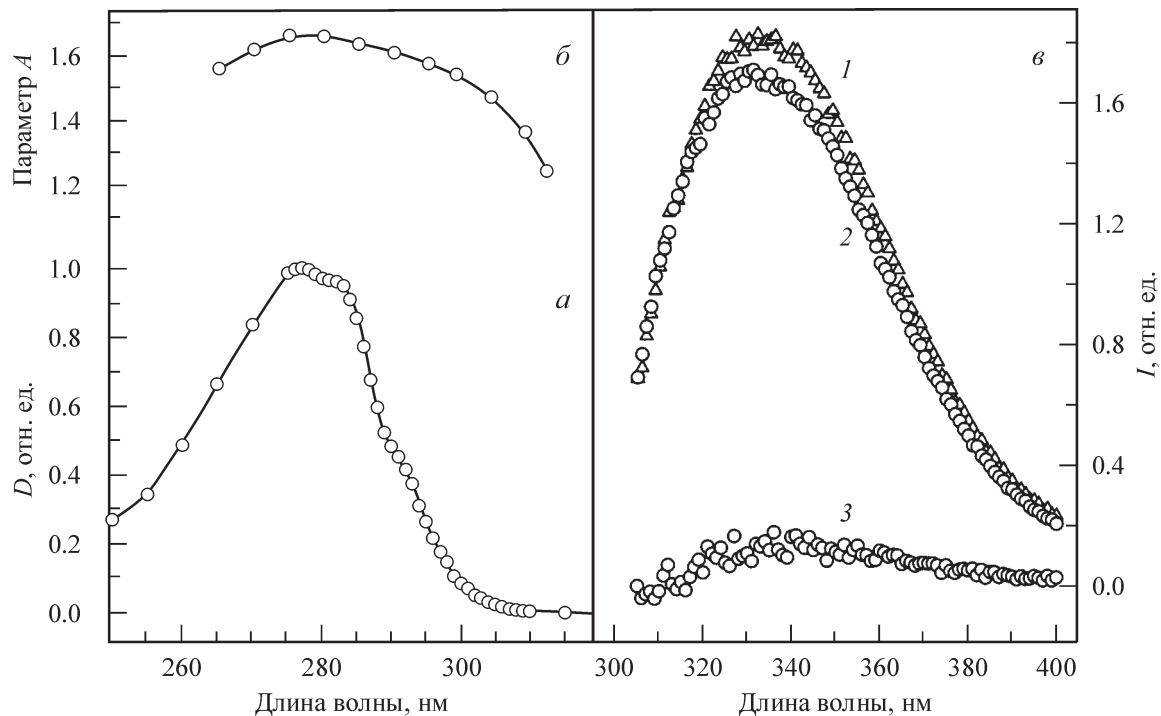


Рис. 9. Спектральные характеристики GlnBP.

a — спектр поглощения; *b* — зависимость величины параметра *A* от длины волны возбуждения; *v* — спектры флуоресценции при длинах волн возбуждения 297 (кривая 1) и 280 (кривая 2) нм. Кривая 3 — $\Delta I(\lambda) = I_{297}(\lambda) - I_{280}(\lambda)$.

Спектр флуоресценции триптофановых остатков более чувствителен к их микроокружению, чем спектр поглощения. Различия спектров поглощения отдельных триптофановых остатков невелики и обычно не принимаются в расчет при анализе флуоресцентных данных. GlnBP — необычный белок, в котором один из двух триптофановых остатков несомненно играет главную роль в поглощении в длинноволновой области спектра. Анализ флуоресцентных экспериментальных данных и характеристик микроокружения двух триптофановых остатков GlnBP позволил нам сделать вывод о том, что Trp 220 является тем остатком, который играет главную роль во флуоресценции белка в случае возбуждения на длинноволновом краю спектра поглощения. Позднее этот вывод должен быть доказан повторным изучением мутантных форм Trp32Phe и Trp 220Phe GlnBP. Однако мы полагаем, что отработанный подход, основанный на анализе экспериментальных флуоресцентных данных с учетом характеристик микроокружения триптофановых остатков и особенностей их локализации в белке, эффективен и обладает предсказательной силой. В самом деле, этот подход уже позволил нам предположить, что тушение единственного Trp 48 азурина его медным центром имеет далекодействующий характер и вызвано удалением электрона от индольного кольца в возбужденном состоянии (Turoverov et al., 1985), что позднее было доказано экспериментально (Petrich et al., 1987). Более того, мы также показали существование «полостей» вблизи Trp 48 и то, что уникально коротковолновый спектр флуоресценции азурина определяется не столько высокой плотностью и жесткостью, сколько исключительно гидрофобным характером его микроокружения (Turoverov et al., 1985). Позже это наше заключение нашло подтверждение в работе Решетняк с сотрудниками (Reshetnyak et al., 2001). В случае актина этот подход позволил нам

предсказать вклад разных триптофановых остатков в суммарную флуоресценцию этого белка (Kuznetsova et al., 1999). На основании анализа микроокружения триптофановых остатков и особенностей их локализации в макромолекуле актина мы сделали вывод о том, что Trp 79 и Trp 86 не вносят значительного вклада во флуоресценцию из-за наличия тушащих групп вблизи них (особенно SG атома Cys 10 вблизи NE1-атома индольного кольца Trp 86) и эффективного переноса энергии между ними, тогда как основной вклад в суммарную флуоресценцию актина вносят два других триптофановых остатка (Trp 340 и Trp 356), которые расположены в гидрофобном микроокружении (Kuznetsova et al., 1999). Наши выводы были полностью подтверждены в экспериментах по изучению флуоресценции мутантных форм рекомбинантного актина с триптофановыми остатками, замененными на фенилаланиновые (Doyle et al., 2001).

К сожалению, причины аномального спектра поглощения Trp 220 остаются невыясненными. Кроме того, неясно, как часто такое различие в спектрах поглощения отдельных триптофановых остатков встречается в белках. Существование различий в спектрах поглощения (возбуждения) и спектрах флуоресценции триптофановых остатков может быть полезным при разработке подхода для разложения многокомпонентного белкового спектра флуоресценции на составляющие.

Таким образом, результаты этой работы свидетельствуют о том, что характеристики триптофановой флуоресценции при возбуждении светом с длинами волн 280 и 297 нм могут различаться. Этот факт следует учитывать при расчете вклада тирозиновых остатков в суммарную флуоресценцию белка при возбуждении светом с длиной волны 280 нм. Кроме того, этот эффект, очевидно, может являться причиной различий в длинноволновой области спектров флуоресценции некоторых белков

(приведенных к интенсивности флуоресценции при 365 нм), измеренных при возбуждении светом с длинами волн 280 и 297 нм. В этом случае для представления таких спектров в сопоставимых единицах необходимо учитывать величину отношения $(I_{280}/I_{297})_{365}$. Для определения этого отношения наряду со спектрами флуоресценции нативного белка необходимо измерять спектры флуоресценции полностью развернутого белка при возбуждении светом с длинами волн 280 и 297 нм.

Равновесные зависимости интенсивности триптофановой флуоресценции и параметра A , характеризующего положение спектра флуоресценции, свидетельствует о существовании по крайней мере двух переходов в области концентраций от 0 до 3 М GdnHCl (рис. 5, а, в). Обычно сдвиги спектров флуоресценции характеризуют изменением положения их максимумов. Однако трудно точно определить максимум широкого гладкого спектра, такого как спектр флуоресценции GlnBP. Поэтому мы используем для регистрации сдвигов спектра флуоресценции отношение интенсивностей флуоресценции, измеренных на двух противоположных склонах спектра ($A = I_{320}/I_{365}$). Эта характеристика чувствительна даже к небольшим сдвигам спектра флуоресценции, поскольку интенсивности I_{320} и I_{365} регистрируются на крутых участках спектра и изменение этих величин при сдвиге спектра входит с разным знаком в отношении I_{320}/I_{365} (Туроверов и др., 1998; Turoverov, Kuznetsova, 2003). Полученные зависимости параметра A от концентрации GdnHCl свидетельствуют о том, что первый переход начинается при небольших концентрациях GdnHCl (0.2 М) и заканчивается при 0.7 М GdnHCl, а второй переход, соответствующий, очевидно, разворачиванию структуры белка, начинается при 1.4 М GdnHCl и заканчивается при 2.1 М GdnHCl.

В отличие от интенсивности флуоресценции и положения спектра флуоресценции величина анизотропии флуоресценции остается неизменной до 1.4 М GdnHCl, т. е. до начала второго перехода. Можно предположить, что в области от 0.0 до 1.4 М GdnHCl белок сохраняет глобулярную структуру и достаточно жесткое микроокружение триптофановых остатков, которое ограничивает внутримолекулярную подвижность индольных колец. Это предположение не противоречит экспериментальным данным об изменении положения спектра флуоресценции и КД в ближней УФ-области спектра. При изучении релаксационных свойств структуры белка необходимо различать подвижность микроокружения триптофановых остатков и подвижность самих триптофановых остатков. Положение спектра триптофановой флуоресценции и форма спектра КД в ближней УФ-области спектра зависят от подвижности микроокружения триптофановых остатков, тогда как величина анизотропии флуоресценции определяется подвижностью самих триптофановых остатков. Ранее мы показали, что выраженный длинноволновый сдвиг спектра триптофановой флуоресценции не обязательно отражает значительное увеличение подвижности микроокружения триптофановых остатков (Кузнецова, Туроверов, 1983; Туроверов, Кузнецова, 1998). Более того, длинноволновый сдвиг спектра триптофановой флуоресценции может сопровождаться увеличением величины анизотропии флуоресценции (Туроверов и др., 1998; Turoverov et al., 1999).

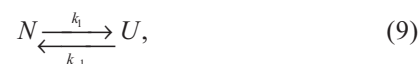
Кроме того, возможно другое, более простое объяснение этого эффекта. Можно предположить наложение двух

факторов, противоположных по своему влиянию на величину анизотропии триптофановой флуоресценции: увеличение подвижности триптофановых остатков, которое сопровождается уменьшением анизотропии флуоресценции, и уменьшение времени жизни триптофановой флуоресценции (табл. 1), которое сопровождается увеличением анизотропии флуоресценции. Существенное разрушение вторичной структуры GlnBP в области 0.1—0.6 М GdnHCl, о котором свидетельствуют данные КД в дальней УФ-области спектра (рис. 5, в), подтверждает предположение о том, что частичное разворачивание GlnBP в этой области концентраций GdnHCl сопровождается увеличением подвижности триптофановых остатков.

Для того чтобы охарактеризовать частично-свернутые переходные состояния GlnBP, было изучено связывание гидрофобного флуоресцентного красителя АНС (рис. 5, д). Существенное увеличение флуоресценции АНС в области перехода $N \rightarrow I_1$ могло бы быть связано с возникновением состояния, похожего на «расплавленную глобулу». Это предположение, однако, противоречит данным КД в дальней УФ-области спектра, которые свидетельствуют о разрушении вторичной структуры GlnBP в результате перехода $N \rightarrow I_1$.

Несмотря на сложный характер денатурации GlnBP, было обнаружено, что денатурация GlnBP обратима. Флуоресцентные характеристики GlnBP в растворах 1.38, 0.71, 0.50 и 0.43 М GdnHCl не зависят от того, были эти растворы получены в процессе денатурации или ренатурации из 3.0 М GdnHCl (рис. 5, а—в, д).

Кинетические эксперименты. Определение констант скоростей процессов сворачивания — разворачивания. Как уже отмечалось, процесс денатурации GlnBP/Gln происходит значительно медленнее денатурации GlnBP (рис. 7). Можно было бы ожидать, что промежуточные состояния, обнаруженные в стационарных экспериментах, будут также зарегистрированы и в кинетических экспериментах. Тем не менее кинетические зависимости интенсивности флуоресценции GlnBP не имеют экстремумов. Поэтому мы обрабатывали эти кривые в рамках модели одностадийного, обратимого перехода



где N — нативное состояние, U — развернутое состояние, k_1 и k_{-1} — константы скоростей прямой и обратной реакции. В этом случае относительная интенсивность флуоресценции $I(t)$ связана с константами скоростей прямой и обратной реакций соотношением

$$I(k_i, t) = I_0 \left\{ 1 - \left(1 - K_{UN} \frac{1}{I_0} \right) \frac{k_1}{k_1 + k_{-1}} (1 - \exp[-(k_1 + k_{-1})t]) \right\}. \quad (10)$$

Здесь $K_{UN} = I_U/I_N$, I_U и I_N — интенсивности флуоресценции белка в нативном и развернутом состояниях соответственно, I_0 — интенсивность флуоресценции при $t \rightarrow 0$. На основании результатов стационарных экспериментов (рис. 5, а, в) значения величины K_{UN} было взято равным 0.156. Величины констант скоростей k_i и I_0 были определены с помощью метода наименьших квадратов как значения, отвечающие минимуму функции

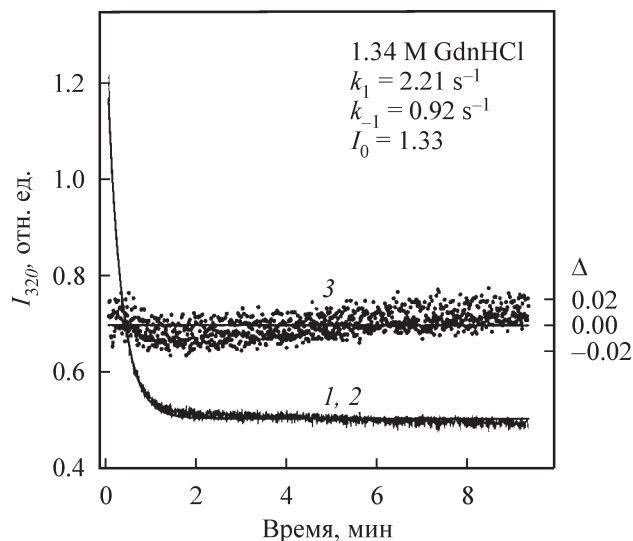


Рис. 10. Анализ кинетической кривой разворачивания GlnBP под действием 1.34 М GdnHCl.

1, 2 — экспериментальная кривая (точки) и расчетная кривая (сплошная линия), наилучшим образом отвечающая экспериментальным данным, которой соответствуют константы скоростей $k_1 = 2.21 \text{ с}^{-1}$ и $k_{-1} = 0.92 \text{ с}^{-1}$ соответственно. Кривая 3 — отклонение экспериментальной кривой от расчетной (взвешенные остатки).

$$\Phi = \sum_t [I_{\text{эксп.}}(t) - I(k_i, t)]^2, \quad (11)$$

где $I_{\text{эксп.}}(t)$ и $I(k_i, t)$ — экспериментальная и расчетная величины интенсивности флуоресценции соответственно. Для примера на рис. 10 приведены экспериментальная кинетическая кривая, полученная при переводе GlnBP в раствор GdnHCl с конечной концентрацией 1.34 М, и расчетная кривая, наилучшим образом отвечающая экспериментальным данным. Этой расчетной кривой отвечают константы скоростей $k_1 = 2.21 \text{ с}^{-1}$ и $k_{-1} = 0.92 \text{ с}^{-1}$. Из данных рис. 10 очевидно, что отклонение расчетной зависимости от экспериментальной не носит статистического характера. Зависимости констант скоростей k_i от концентрации GdnHCl представлены на рис. 11. Как видно, характер зависимости константы скорости k_{-1} от концентрации GdnHCl оказался достаточно неожиданным. Очевидно, простая схема (9) не может описать сложный процесс разворачивания. Тем не менее эта схема дает довольно реалистичные результаты для GlnBP при концентрациях GdnHCl выше 1.4 М и для комплекса GlnBP/Gln во всей области концентраций GdnHCl (рис. 11).

Полученный для комплекса GlnBP/Gln результат можно объяснить сдвигом перехода $N \rightleftharpoons I_1$ (и, возможно, $I_1 \rightleftharpoons I_2$) в область более высоких концентраций GdnHCl, в которой начинается разворачивание структуры белка; это означает, что для комплекса GlnBP/Gln нет таких концентраций GdnHCl, при которых интермедиаты I_1 и I_2 могли бы существенно накапливаться.

Исследование процессов сворачивания и разворачивания белков методом представления в параметрическом виде двух независимых экстенсивных характеристик системы. Для более подробного изучения процесса разворачивания GlnBP и для определения числа промежуточных состояний, возникающих при переходе белка из нативного состояния в развернутое, мы использовали метод фазовых диаграмм (Kuznetsova et al., 2002a, 2002b,

2004; Stepanenko et al., 2004). Этот метод заключается в построении параметрических зависимостей между двумя независимыми экстенсивными характеристиками системы. Любая экстенсивная характеристика системы, состоящей из двух компонент, определяется простым выражением

$$I(\theta) = \alpha_1(\theta)I_1 + \alpha_2(\theta)I_2, \quad (12)$$

где I_1 и I_2 — значения $I(\theta)$, 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, $\alpha_1(\theta) + \alpha_2(\theta) = 1$, θ — любой параметр, при изменении величины которого изменяется доля компонент в системе. В качестве такого параметра могут выступать, например, концентрация денатуранта, температура pH раствора и т. п. Соотношение (12) применимо только для экстенсивных характеристик, описывающих систему количественно, и доля компонент в системе, так же как и константа равновесия K , может быть определена с помощью простых соотношений

$$\alpha_1(\theta) = \frac{I(\theta) - I_2}{I_1 - I_2}, \quad \alpha_2(\theta) = \frac{I_1 - I(\theta)}{I_1 - I_2}, \quad K(\theta) = \frac{I_1 - I(\theta)}{I(\theta) - I_2}. \quad (13)$$

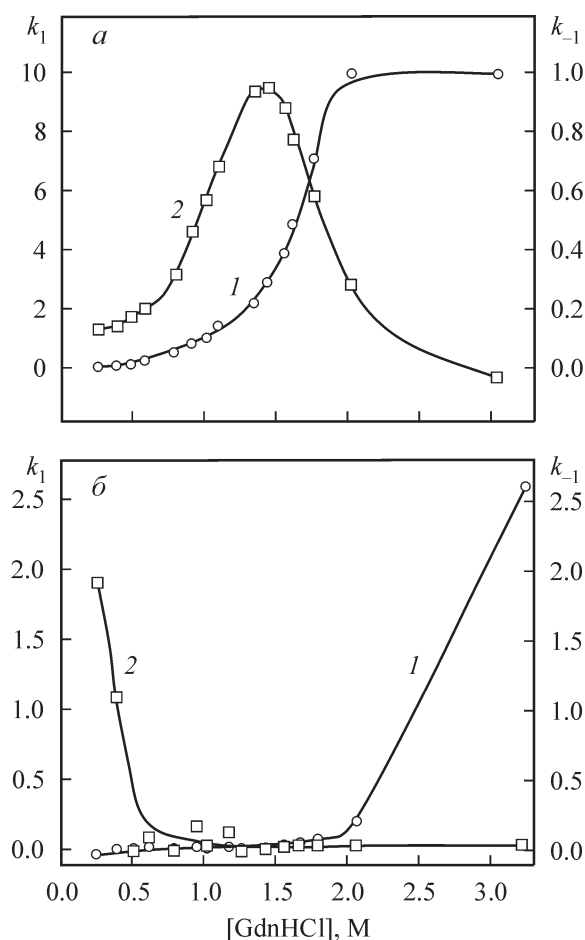


Рис. 11. Зависимости констант скоростей k_1 (1) и k_{-1} (2) процесса разворачивания GlnBP от концентраций GdnHCl в отсутствие (а) и в присутствии (б) Gln.

Эти соотношения не выполняются для интенсивных характеристик системы, таких как положение спектра флуоресценции, параметр A , анизотропия флуоресценции и др., описывающих систему качественно (Eftink, 1994; Эфтинк, 1998), что, однако, часто не принимается в расчет при исследовании конформационных переходов белков. Для любых двух независимых экстенсивных характеристик имеем

$$I_1(\theta) = \alpha_1(\theta)I_{1,1} + \alpha_2(\theta)I_{2,1} \quad (14)$$

и

$$I_2(\theta) = \alpha_1(\theta)I_{1,2} + \alpha_2(\theta)I_{2,2}. \quad (15)$$

Исключая $\alpha_1(\theta)$ и $\alpha_2(\theta)$ из соотношений (14) и (15), мы получим зависимость между $I_1(\theta)$ и $I_2(\theta)$

$$I_1(\theta) = a + bI_2(\theta), \quad (16)$$

где $a = I_{1,1} - \frac{I_{2,1} - I_{1,1}}{I_{2,2} - I_{1,2}} I_{1,2}$ и $b = \frac{I_{2,1} - I_{1,1}}{I_{2,2} - I_{1,2}}$. Соотношение (16)

означает, что если при изменении параметра θ переход между состояниями 1 и 2 происходит по принципу «все или ничего» 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 переход исследуемого объекта из начального в конечное состояние не является одностадийным и происходит с образованием одного или нескольких промежуточных состояний. Этот подход использовали для того, чтобы охарактеризовать промежуточные состояния ряда белков (Bushmarina et al., 2001; Kuznetsova et al., 2002a, 2002b, 2004).

Характер параметрической зависимости между I_{320} и I_{365} , в которой в качестве параметра выбрана концентрация GdnHCl, свидетельствует о существовании двух промежуточных состояний (I_1 и I_2) на пути перехода GlnBP из нативного в развернутое состояние (рис. 12):



Для некоторых концентраций GdnHCl были измерены кинетические зависимости интенсивности флуоресценции GlnBP при длинах волн 320 и 365 нм и построены параметрические зависимости между I_{320} и I_{365} (рис. 13). Параметром в этом случае является время после перевода белка в раствор GdnHCl соответствующей концентрации. Полученные параметрические зависимости хорошо согласуются с аналогичными зависимостями, построенными на основании стационарных измерений интенсивности флуоресценции.

Как и в равновесных экспериментах, обнаружено, что, хотя процесс разворачивания GlnBP является сложным, денатурация GlnBP обратима. Параметрическое представление кинетических зависимостей интенсивности флуоресценции, измеренных при ренатурации белка, показывает, что ренатурация белка, очевидно, проходит через образование тех же промежуточных состояний, что и при денатурации белка (рис. 14).

Переход $N \rightleftharpoons I_1$ происходит в области концентраций GdnHCl от 0.0 до 0.6—0.7 М для GlnBP. Этот переход со-

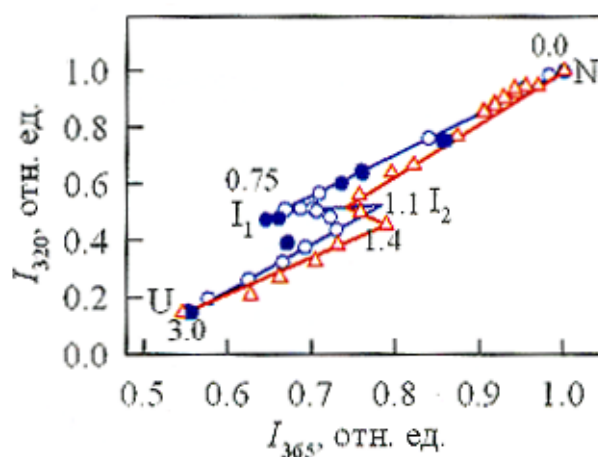


Рис. 12. Параметрические зависимости между интенсивностями флуоресценции, измеренными при длинах волн регистрации 320 (I_{320}) и 365 (I_{365}) нм, характеризующие процесс разворачивания GlnBP (открытые синие кружки) и его комплекса с Gln (открытые красные треугольники) под действием GdnHCl.

Параметр — концентрация GdnHCl. Темные кружки отвечают процессу ренатурации GlnBP. Показаны флуоресцентные характеристики, соответствующие нативному (N), промежуточным (I_1 и I_2) и полностью развернутому (U) состояниям. Цифры у кривых — концентрации GdnHCl.

провождается уменьшением интенсивности флуоресценции (рис. 5, а), уменьшением параметра A (рис. 5, в), увеличением вклада тирозиновых остатков в суммарную флуоресценцию белка (рис. 4, б), а также увеличением интенсивности флуоресценции АНС (рис. 5, е). Незначительность величины анизотропии флуоресценции вплоть до 1.1 М GdnHCl позволяет предполагать, что в этой области концентраций GdnHCl белок сохраняет глобулярную и довольно жесткую структуру, несмотря на существенное уменьшение сигнала КД в дальней УФ-области спектра (см. выше).

Переход $I_1 \rightleftharpoons I_2$ хорошо проявляется в равновесной зависимости интенсивности флуоресценции, измеренной при 365 нм (рис. 5, б), и в параметрических зависимостях (рис. 12). Более того, для GlnBP существование I_2 видно из сравнения равновесных зависимостей анизотропии флуоресценции r и интенсивности флуоресценции АНС от концентрации GdnHCl (рис. 5, д, е). Увеличение интенсивности флуоресценции АНС соответствует переходу $N \rightarrow I_1$. Интенсивность флуоресценции АНС начинает уменьшаться раньше полного разворачивания белка, что отражается в уменьшении анизотропии флуоресценции. Разумно предположить, что существует дополнительный переход ($I_1 \rightarrow I_2$), сопровождаемый уменьшением интенсивности флуоресценции АНС, который предшествует полному разворачиванию белка ($I_1 \rightarrow U$). Переход $I_1 \rightarrow I_2$ происходит в области 0.75—1.10 М GdnHCl. В то же время ни зависимость интенсивности флуоресценции при длине волны регистрации 320 нм, ни зависимость параметра A не дают никаких свидетельств существования перехода в этой области концентраций GdnHCl. Согласно данным КД в дальней УФ-области спектра, вторичная структура также не меняется в этой области концентраций GdnHCl (рис. 5, з).

Переход $I_2 \rightleftharpoons U$ происходит в области 1.1—2.4 М GdnHCl. В результате этого перехода разрушается компактная глобулярная структура. Прежде всего это видно

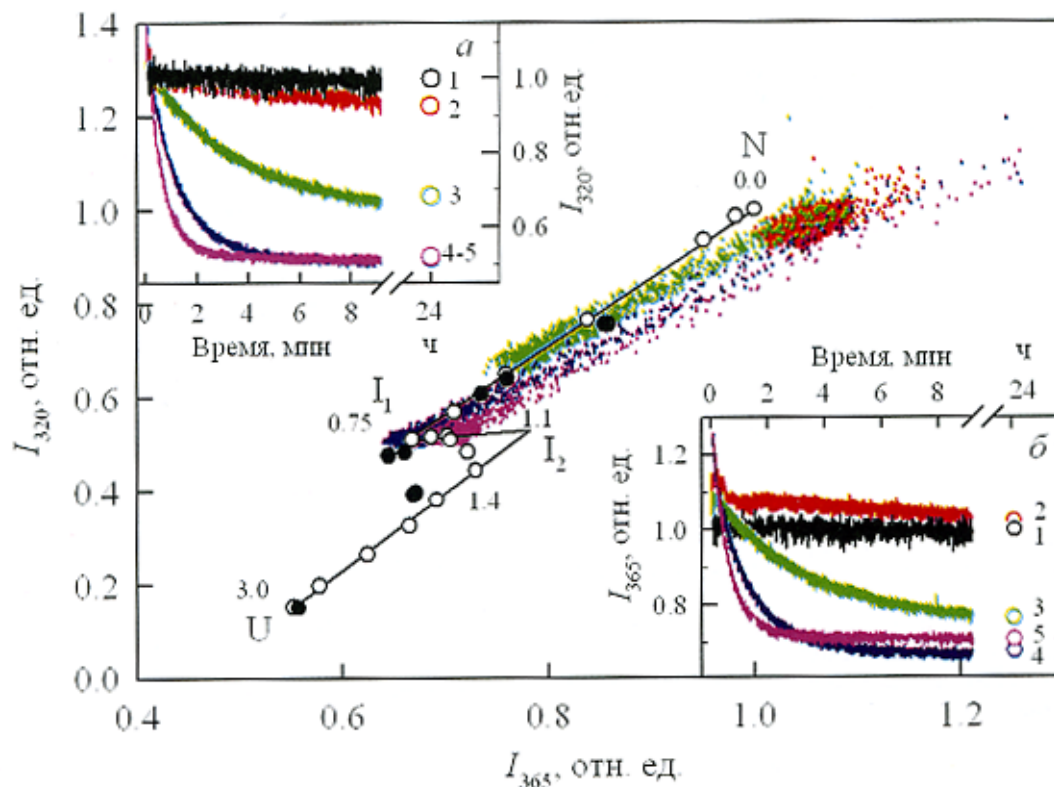


Рис. 13. Параметрические зависимости между I_{320} и I_{365} , характеризующие кинетику процесса разворачивания GlnBP при разных концентрациях GdnHCl.

Параметр — время. Значения I_{320} (вставка а) и I_{365} (вставка б) взяты из кинетических кривых разворачивания GlnBP при следующих концентрациях GdnHCl: 0.26 М (кривая 2, красная), 0.50 (кривая 3, зеленая), 0.78 (кривая 4, голубая) и 1.01 М (кривая 5, розовая). Кривая 1 (черная) — цвет на вставках а и б соответствует 0.0 М GdnHCl. Параметрические кривые, построенные на основе кинетических данных, наложены на кривую, полученную на основании стационарных экспериментов (сплошная линия и кружки; см. подпись к рис. 12).

по значительному длинноволновому сдвигу спектра флуоресценции, т. е. по уменьшению параметра A (рис. 5, в), что позволяет предполагать увеличение полярности микроокружения триптофановых остатков. Уменьшение анизотропии флуоресценции в этой области концентраций GdnHCl (рис. 5, д) говорит об увеличении подвижности триптофановых остатков и их микроокружения. Об увеличении подвижности микроокружения триптофановых остатков при этих концентрациях GdnHCl свидетельствует также изменение спектра КД в ближней УФ-области спектра (рис. 6). Существенное уменьшение эллиптичности при 222 нм (рис. 5, з) свидетельствует о разрушении вторичной структуры белка в результате данного перехода. Интересно, что уменьшение интенсивности флуоресценции АНС начинается при концентрациях GdnHCl, которые существенно меньше, чем те, при которых начинается переход $I_2 \rightleftharpoons U$. Это косвенно подтверждает существование состояния I_2 , а также означает, что при переходе в состояние I_2 белок теряет способность связывать АНС.

Так как GlnBP — двухдоменный белок, мы не можем не учитывать возможности того, что домены разворачиваются последовательно. В то же время переход $N \rightarrow I_1$ нельзя объяснить разворачиванием малого домена (который не имеет триптофановых остатков), так как он сопровождается существенными изменениями флуоресцентных характеристик. С помощью FTIR была показана более низкая термочувствительность α -спиралей белка по сравнению с β -листами (D'Auria et al., 2005). Возмож-

но, α -спирали GlnBP также менее устойчивы к денатурирующему действию GdnHCl. В этом отношении существенно отметить, что тепловая денатурация (в противоположность разворачиванию под действием GdnHCl) никогда не приводит к полной денатурации белка. Таким образом, мы можем предположить, что в нашем случае переход $N \rightarrow I_1$ сопровождается разворачиванием α -спиралей, тогда как переход $I_1 \rightarrow I_2$ связан с разрушением β -листов.

Разворачивание и сворачивание комплекса GlnBP с Gln. Стабилизация структуры GlnBP при взаимодействии с лигандом. Связывание L-глутамин приводит к закрытию щели и существенным структурным изменениям с формированием так называемой закрытой формы белка (рис. 1, файл PDB 1WND; Sun et al., 1998). Тем не менее связывание Gln вызывает незначительные изменения в микроокружении Trp 32 и Trp 220. Для GlnBP/Gln в микроокружении обоих триптофановых остатков входит по 65 атомов. Как говорилось выше, в микроокружении Trp 32 есть только одна полярная группа — это OH-группа Trp 43. Положение этой группы лишь слегка изменяется при формировании комплекса GlnBP/Gln. Хотя число атомов в микроокружении Trp 220 практически одинаково для белка без лиганда и для белка, связанного с лигандом, их состав претерпевает некоторые изменения. В микроокружении Trp 220 GlnBP входят Pro 15, Phe 18, Phe 27, Phe 221 и Tyr 163, тогда как для GlnBP/Gln в микроокружении остаются только Pro 15, Phe 18 и Phe 27.

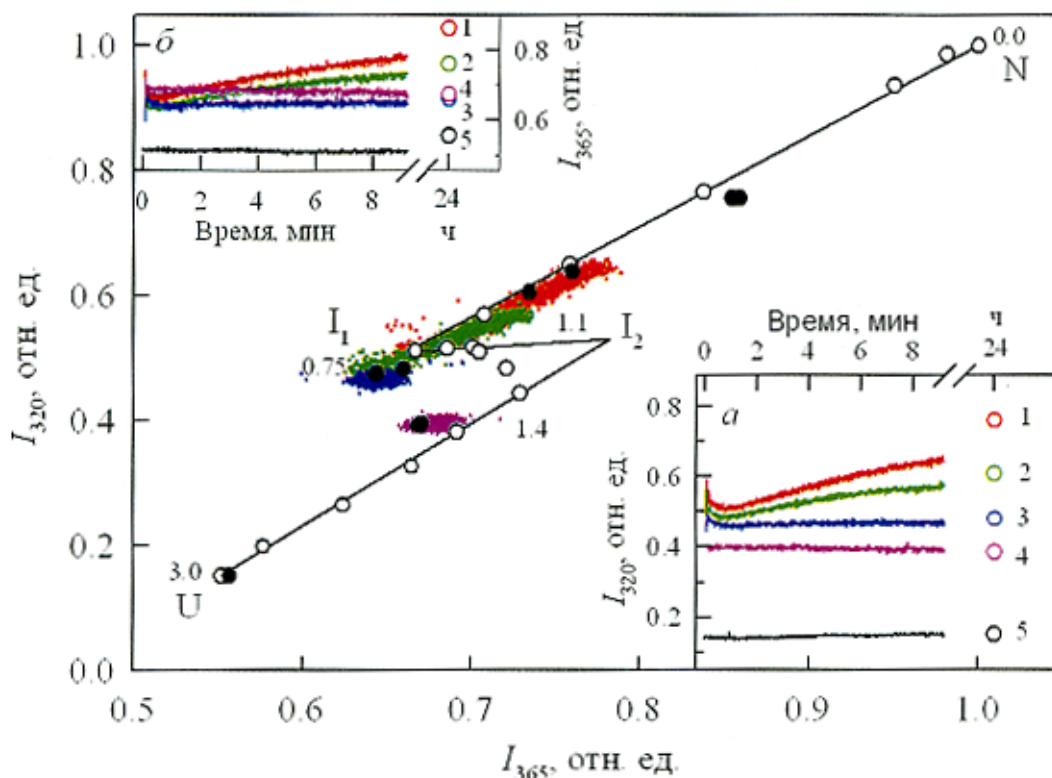


Рис. 14. Параметрические зависимости между I_{320} и I_{365} , характеризующие кинетику процесса ренатурации GlnBP из 3.02 M GdnHCl.

Параметр — время. Значения I_{320} (вставка а) I_{365} , (вставка б) взяты из кинетических кривых ренатурации GlnBP при следующих концентрациях GdnHCl: 0.43 M (кривая 2, красная), 0.50 (кривая 3, зеленая), 0.71 (кривая 4, голубая) и 1.38 M (кривая 5, розовая). Кривая 1 (черная) на вставках а и б соответствует 3.02 M GdnHCl. Параметрические кривые, построенные на основе кинетических данных, наложены на кривую, полученную на основании стационарных экспериментов (сплошная линия и кружки; см. подпись к рис. 12).

Phe 221 и Tyr 163, принадлежащие другому домену, уходят из микроокружения Trp 220, когда образуется комплекс. Интересно, что в отсутствие лиганда в микроокружении Trp 220 больше полярных групп (шесть), чем в комплексе с Gln (четыре). При образовании комплекса ОН-группа Tyr 163 и N 2 Lys 166 уходят из микроокружения, тогда как ориентация и расстояние до центра триптофанового остатка для других групп меняется только слегка (рис. 1). Эти данные объясняют, почему связывание лиганда лишь незначительно влияет на спектр триптофановой флуоресценции GlnBP (рис. 2). Результаты FTIR (D’Auria et al., 2005) говорят о том, что связывание Gln вызывает только небольшие изменения во вторичной структуре белка. В настоящей работе также показано, что связывание Gln делает структуру GlnBP более термостабильной.

Для того чтобы оценить стабильность GlnBP и его комплекса с Gln, были измерены зависимости интенсивности флуоресценции при длине волны регистрации 320 нм (рис. 15, а) и КД в дальней УФ-области спектра (данные не показаны) от температуры. Эти зависимости были использованы для определения изменения свободной энергии Гиббса при разворачивании белка (Nolting, 1999):

$$\Delta G^0(T) = \Delta H_m^0(1 - T/T_m) - \Delta C_p^0[(T_m - T) + T \ln(T/T_m)], \quad (18)$$

где ΔH_m^0 и ΔC_p^0 — изменения энтальпии и удельной теплоемкости соответственно, а T_m — температура середины перехода. Параметры соотношения Гиббса—Гельм-

гольца (18) определяли из аппроксимации кривой, описываемой следующим выражением:

$$I(T) = \frac{I_N(T) + I_U(T) \exp[-\Delta G^0(T)/RT]}{1 + \exp[-\Delta G^0(T)/RT]}. \quad (19)$$

Здесь $I(T)$ — экспериментальные величины, $I_N(T)$ и $I_U(T)$ — величины сигнала для свернутого и развернутого состояний белка при температуре T ($I_N(T) = a_N + b_N(T)$ и $I_U(T) = a_U + b_U(T)$).

Все переменные ($a_N, b_N, a_U, b_U, \Delta H_m^0, \Delta C_p^0$ и T_m) определяли методом нелинейной регрессии с помощью программы Sigma Plot. Полученные результаты представлены в табл. 5. Эти данные говорят о стабилизации белка при формировании его комплекса с Gln. На рис. 15, б показаны зависимости ΔG^0 от температуры для GlnBP и GlnBP/Gln, характеризующие температурную стабильность этих белков. К этим результатам нужно относиться с известной осторожностью, поскольку процесс разворачивания GlnBP и GlnBP/Gln не является одностадийным.

Наши данные говорят о том, что структура комплекса GlnBP/Gln не только более термостабильна по сравнению с GlnBP (рис. 15), но также более устойчива к денатурирующему действию GdnHCl. В самом деле, для GlnBP/Gln переход $N \rightleftharpoons I_1$ происходит при более высокой концентрации GdnHCl (рис. 5, а–г, е). Это означает, что процессы $N \rightleftharpoons I_1, I_1 \rightleftharpoons I_2$ и $I_2 \rightleftharpoons U$ происходят в более

Таблица 5

Термодинамические параметры процесса разворачивания GlnBP и GlnBP/Gln

Параметр	GlnBP		GlnBP/Gln	
	флуоресценция	дальний КД	флуоресценция	дальний КД
Температурная денатурация				
T_m , °C	58.0	61.5	69.6	68.8
ΔG^0 (23 °C), ккал·моль ⁻¹	1.54	1.75	3.36	2.87
ΔH^0 (23 °C), ккал·моль ⁻¹	23.06	23.69	48.17	36.21
ΔC_p^0 , ккал·моль ⁻¹ ·град ⁻¹	0.47	0.42	0.96	0.63
Разворачивание под действием GdnHCl				
m , ккал·моль ⁻¹ ·M ⁻¹			2.05	2.25
$D_{50\%}$, M			1.13	1.52
ΔG^0 (23 °C), ккал·моль ⁻¹			2.31	3.42

узкой области концентраций GdnHCl. В результате связывания Gln разворачивание белка становится более кооперативным и белок выдерживает большие концентрации GdnHCl. Это создает видимость того, что процесс денатурации GlnBP/Gln происходит с образованием то-

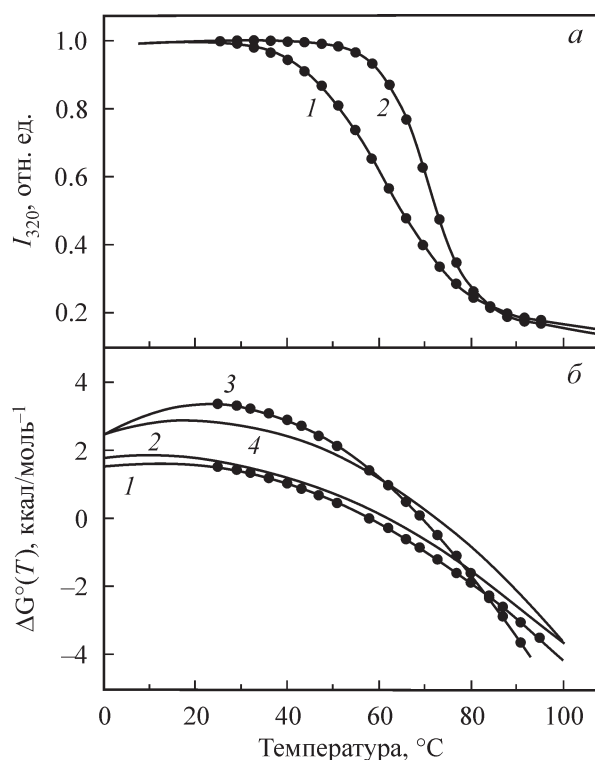


Рис. 15. Температурная стабильность GlnBP и его комплекса GlnBP/Gln.

a — кривые 1, 2 представляют изменения интенсивности флуоресценции при 320 нм для GlnBP и GlnBP/Gln соответственно, $\lambda_{\text{возб.}} = 297$ нм. Кривые, соответствующие экспериментальным данным (точки), построены в программе SigmaPlot с использованием соотношений (18) и (19). *б* — температурные зависимости равновесной стабильности GlnBP (1, 2) и его комплекса GlnBP/Gln (3, 4), полученные из анализа экспериментальных данных по собственной флуоресценции (1, 3) и КД в дальней УФ-области спектра (2, 4).

лько одного промежуточного состояния. Тем не менее характер параметрических зависимостей между I_{320} и I_{365} (рис. 12, 13) однозначно показывает, что процесс разворачивания GlnBP/Gln, так же как и GlnBP, является трехстадийным.

Стабильность GlnBP и GlnBP/Gln в отсутствие денатуранта ($\Delta G^0([0])$) была определена на основании соотношения

$$\Delta G^0([\text{GdnHCl}]) = \Delta G^0([0]) - m[\text{GdnHCl}]. \quad (20)$$

Различие между концентрациями денатуранта, отвечающими середине перехода для кривых разворачивания GlnBP/Gln, измеренных методом собственной флуоресценции ($D_{50\%} = 1.13$ M GdnHCl) и КД в дальней УФ-области спектра ($D_{50\%} = 1.52$ M GdnHCl) (рис. 5, *a*, *з*), позволяет предполагать, что процесс разворачивания не отвечает принципу «все или ничего».

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48231), INTAS (грант 01-2347) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- 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.
- Туроверов К. К., Бикташев А. Г., Дорофеев А. В., Кузнецова И. М. 1998. Комплекс аппаратных и программных средств для измерения спектральных, поляризационных и кинетических характеристик флуоресценции в растворе. Цитология. 40 (8/9) : 806—817.
- Туроверов К. К., Кузнецова И. М. 1998. Собственная УФ-флуоресценция белков как инструмент для изучения их динамики. Цитология. 40 (8/9) : 735—746.
- Эфтинк М. Р. 1998. Использование флуоресцентных методов для изучения разворачивания белков. Биохимия. 63 (3) : 327—337.
- Arai M., Kuwajima K. 2000. Role of the molten globule state in protein folding. Adv. Protein Chem. 53 : 209—282.
- Axelsen P. H., Bajzer Z., Prendergast F. G., Cottam P. F., Ho C. 1991. Resolution of fluorescence intensity decays of the two tryptophan residues in glutamine-binding protein from *Escherichia coli* using single tryptophan mutants. Biophys. J. 60 : 650—659.
- 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 macromolecular structures. J. Mol. Biol. 112 : 535—542.
- Bilsel O., Matthews C. R. 2000. Barriers in protein folding reactions. Adv. Protein Chem. 53 : 153—207.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248—254.
- 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.
- Bychkova V. E., Ptitsyn O. B. 1993. The molten globule *in vitro* and *in vivo*. Chemtracts-Biochem. Mol. Biol. 4 : 133—163.

- Carrell R. W., Gooptu B. 1998. Conformational changes and disease — serpins, prions and Alzheimer's. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8 : 799—809.
- Dale R. E., Eisinger J. 1974. Intramolecular distances determined by energy transfer. Dependence on orientational freedom of donor and acceptor. *Biopolymers.* 13 : 1573—1605.
- Dattelbaum J. D., Lakowicz J. R. 2001. Optical determination of glutamine using a genetically engineered protein. *Anal. Biochem.* 291 : 89—95.
- D'Auria S., Lakowicz J. R. 2001. Enzyme fluorescence as a sensing tool: new perspectives in biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12 : 99—104.
- D'Auria S., Scire A., Varriale A., Scognamiglio V., Staiano M., Ausili A., Marabotti A., Rossi M., Tanfani F. 2005. Binding of glutamine to glutamine-binding protein from *Escherichia coli* induces changes in protein structure and increases protein stability. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* 58: 80—87.
- Dinner A. R., Sali A., Smith L. J., Dobson C. M., Karplus M. 2000. Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. *Trends Biochem. Sci.* 25 : 331—339.
- Dobson C. M. 2003. Protein folding and misfolding. *Nature.* 426 : 884—890.
- Doyle T. C., Hansen J. E., Reisler E. 2001. Tryptophan fluorescence of yeast actin resolved via conserved mutations. *Biophys. J.* 80 : 427—434.
- Eftink M. R. 1994. The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biophys. J.* 66 : 482—501.
- Eisinger J., Feuer B., Lamola A. A. 1969. Intramolecular singlet excitation transfer. Applications to polypeptides. *Biochemistry.* 8 : 3908—3915.
- 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.
- Grantcharova V., Alm E. J., Baker D., Horwich A. L. 2001. Mechanisms of protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 : 70—82.
- Grinvald A., Steinberg I. Z. 1976. The fluorescence decay of tryptophan residues in native and denatured proteins. *Biochim. biophys. acta.* 427 : 663—678.
- 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.
- Hsiao C.-D., Sun Y.-J., Rose J., Wang B.-C. 1996. The crystal structure of glutamine-binding protein from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 262 : 225—242.
- Humphrey W., Dalke A., Schulten K. 1996. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graphics.* 14 : 33—38.
- Jaenicke R., Lilie H. 2000. Folding and association of oligomeric and multimeric protein. *Adv. Protein Chem.* 53 : 329—401.
- Kim P. S., Baldwin R. L. 1990. Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 59 : 631—660.
- Kuznetsova I. M., Stepanenko Olga V., Stepanenko Olesia V., Povarova O. I., Biktashev A. G., Verkhusha V. V., Shavlovskiy 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. Unraveling multistate unfolding of rabbit muscle creatine kinase. *Biochim. biophys. acta.* 1596 : 138—155.
- Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Uversky V. N. 2004. Use of the phase diagram method to analyze the protein unfolding-refolding reactions: fishing out the «invisible» intermediates. *J. Proteome Res.* 3 : 485—494.
- Kuznetsova I. M., Yakusheva T. A., Turoverov K. K. 1999. Contribution of separate tryptophan residues to intrinsic fluorescence of actin. Analysis 3D structure. *FEBS Lett.* 452 : 205—210.
- Lakowicz J. R. 1999. Principles of fluorescence spectroscopy. New York: Acad. / Plenum Publ. 698 p.
- Marquardt D. W. 1963. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Indust. Appl. Math.* 11 : 431—441.
- Merritt E. A., Bacon D. J. 1977. Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Methods in Enzymol.* 277 : 505—524.
- Nolting B. 1999. Protein folding kinetics. Biophysical methods. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag. 145 p.
- Pang A., Arinaminpathy Y., Sansom M. S., Biggin P. C. 2003. Interdomain dynamics and ligand binding: molecular dynamics simulations of glutamine binding protein. *FEBS Lett.* 550 : 168—174.
- Petrich J. W., Longworth J. W., Fleming G. R. 1987. Internal motion and electron transfer in proteins: a picosecond fluorescence study of three homologous azurins. *Biochemistry.* 26 : 2711—2722.
- Plotkin S. S., Onuchic J. N. 2002. Understanding protein folding with energy landscape theory. I. Basic concepts. *Quart. Rev. Biophys.* 35 : 111—167.
- Ptitsyn O. B. 1995. Molten globule and protein folding. *Adv. Protein Chem.* 47: 83—229.
- Radford S. 2000. Protein folding: progress made and promises ahead. *Trends Biochem. Sci.* 25 : 611—618.
- Reshetnyak Y. K., Koshevnik Y., Burstein E. A. 2001. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. III. Correlation between fluorescence and microenvironment parameters of individual tryptophan residues. *Biophys. J.* 81 : 1735—1758.
- 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. Z. 1971. Long-range nonradiative transfer of electronic excitation energy in proteins and polypeptides. *Ann. Rev. Biochem.* 40 : 83—114.
- Stepanenko Olga V., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Chunjuan H., Wang C.-C. 2004. Conformational change of dimeric DsbC molecule induced by GdnHCl — a study by intrinsic fluorescence. *Biochemistry.* 43 : 5296—5303.
- Sun Y. J., Rose J., Wang B. C., Hsiao C. D. 1998. The structure of glutamine-binding protein complexed with glutamine at 1.94 Å resolution: comparisons with other amino acid binding proteins. *J. Mol. Biol.* 278 : 219—229.
- Turoverov K. K., Biktashev A. G., Khaitlina S. Yu., Kuznetsova I. M. 1999. The structure and dynamics of partially-folded actin. *Biochemistry.* 38 : 6261—6269.
- Turoverov K. K., Kuznetsova I. M. 2003. Intrinsic fluorescence of actin. *J. Fluorescence.* 13 : 41—57.
- Turoverov K. K., Kuznetsova I. M., Zaitzev V. N. 1985. The environment of the tryptophan residue in *Pseudomonas aeruginosa* azurin and its fluorescence properties. *Biophys. Chem.* 23 : 79—89.
- Weiner J. H., Heppel L. A. 1971. A binding protein for glutamine and its relation to active transport in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 246 : 6933—6941.
- Wetzel R. 1994. Mutations and off-pathway aggregation of proteins. *Trends Biotechnol.* 12 : 193—198.
- Zuker M., Szabo A. G., Bramall L., Krajcarski D. T., Selinger B. 1985. The delta function convolution method (DFCM) for fluorescence decay experiments. *Rev. Sci. Instrum.* 56 : 14—22.

THE STRUCTURE AND STABILITY OF THE GLUTAMINE-BINDING PROTEIN
FROM *ESCHERICHIA COLI* AND ITS COMPLEX WITH GLUTAMINE

Olga V. Stepanenko,¹ I. M. Kuznetsova,¹ K. K. Turoverov,¹
V. Scognamiglio,² M. Staiano,² S. D'Auria²

¹ Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg, Russia, and ² Institute of Protein Biochemistry, Naples, Italy;
¹ e-mail: kkt@mail.cytspb.rssi.ru

A study was made of the conformational changes in the *Escherichia coli* glutamine-binding protein (GlnBP) induced by GdnHCl, and of the effect of glutamine (Gln) binding on these processes. Intrinsic fluorescence, ANS emission fluorescence, and far- and near-UV circular dichroism spectroscopy were used. The obtained experimental data were interpreted, taking into the account results of the analysis of tryptophan and tyrosine residues microenvironments. This enabled us to explain the negligible contribution of Tyr residues to the bulk fluorescence of the native protein, the similarity of fluorescence characteristics of GlnBP and GlnBP/Gln, and an uncommon effect of the excess of fluorescence intensity at 365 nm (Trp emission) upon excitation at 297 nm compared to the excitation at 280 nm. The latter effect is explained by the spectral dependence of Trp 32 and Trp 220 contributions to protein absorption. The dependence of Trp fluorescence of protein on the excitation wavelength must be taken into account for the evaluation of Tyr residues contribution to the bulk fluorescence of protein, and in principle, it may also be used for the development of an approach to decomposition of multi-component protein fluorescence spectrum. The parametric presentation of fluorescence data showed that both GlnBP unfolding and GlnBP/Gln unfolding are three-step processes ($N \rightarrow I_1 \rightarrow I_2 \rightarrow U$), though in the case of the GlnBP/Gln complex these stages essentially overlap. Despite its complex character, GlnBP unfolding is completely reversible. In comparison with GlnBP, in the case of GlnBP/Gln the dramatic shift of $N \rightarrow I_1$ process to higher GdnHCl concentrations is shown.

Key words: glutaminebinding protein, protein folding, protein stability, intrinsic fluorescence.