

ГЛОБУЛЯРНЫЙ АКТИН — ЧАСТИЧНО ВНУТРЕННЕ НЕУПОРЯДОЧЕННЫЙ БЕЛОК С КВАЗИСТАЦИОНАРНОЙ СТРУКТУРОЙ

© **O. И. Поварова^{1,*}, Ю. А. Гагарская^{1, 2}, В. Н. Уверский^{1, 3, 4}**
И. М. Кузнецова¹, К. К. Туроверов^{1, 2}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,

² С.-Петербургский государственный политехнический университет Петра Великого, 194064,

³ Университет Южной Флориды, Тампа, США, 33620-5550,

и ⁴ Институт биологического приборостроения РАН, Пущино, 142290;

* электронный адрес: olp@incras.ru

Показано, что нативный глобулярный актин (G-актин) является термодинамически нестабильным (квазистационарным) белком. Эта форма белка, стабилизируемая ионом Mg²⁺ (который *in vitro* замещен на ион Ca²⁺), возникает *in vivo* в результате сложных посттрансляционных энергозатратных процессов фолдинга с участием шаперона Hsp70, префолдина и шаперонина CCT, обеспечивающих возникновение нативной структуры, стабилизируемой Mg²⁺ и АТФ. Структуры, образующиеся из полипептидной цепи актина, должны постоянно находиться в комплексе со своими партнерами: с шапероном Hsp70, префолдином, шаперонином CCT — при фолдинге, с ионом Mg²⁺ и АТФ — в нативном состоянии, с многочисленными актинсвязывающими белками — при образовании и функционировании цитоскелета клетки, с миозином и другими белками системы мышечного сокращения в мышечных клетках. Денатурация актина сопровождается самоассоциацией молекул актина, приводящей к образованию компактной термодинамически стабильной структуры, состоящей из 14—16 молекул белка, так называемого инактивированного актина (I-актина). Квазистационарное состояние нативных белков, по-видимому, широко распространено в природе. Возникновение такого состояния является энергозатратным и сопряжено с неспособностью полипептидной цепи образовывать нативную компактную структуру без участия помощников (сложной машинерии фолдинга белков в клетке) и без взаимодействия со своими естественными партнерами, в частности с ионами металлов.

Ключевые слова: актин, агрегация, внутренне неупорядоченные белки, инактивированный актин, квазистационарное состояние, нативная структура, фолдинг.

Принятые сокращения: АНС — 1-анилинонафталин-8-сульфонат, КД — круговой дихроизм, IDP (intrinsically disordered protein) — внутренне неупорядоченный белок, GdnHCl — гуанидингидрохлоид, G-актин — глобулярный актин, F-актин — фибриллярный актин, I-актин — инактивированный актин, CCT — chaperon containing TCP-1 (TCP-1 — tailless complex polypeptide-1), I_{arp} — агрегаты I-актина.

Актин является одним из наиболее распространенных и вездесущих белков живых организмов. Этот белок находится в каждой живой клетке, наиболее богаты актином мышечные клетки, из которых он и был выделен впервые в середине прошлого столетия. С момента его открытия актин является активно исследуемым объектом, и до сих пор интерес исследователей к нему не угас (рис. 1). Исследования актина начались с изучения способности мышечного актина к полимеризации и взаимодействия актина с мышечным белком миозином и рядом других белков, в том числе и регуляторных, контролирующих мышечное сокращение. В начале 1970-х годов стало очевидным, что актином богаты не только мышечные, но и другие эукариотические клетки. Актин обнаруживают в цитоплазме и межклеточном пространстве. Главная функция актина немышечных эукариотических клеток — формирование цитоскелета, обеспечение клеточной подвижности и участие в межклеточном взаимодействии.

Дальнейшие исследования показали, что актин участвует и во многих других жизненно важных клеточных процессах. Первое упоминание о существовании ядерного актина появилось практически в одно время с открытием цитоплазматического актина. На рубеже столетий появились работы, в которых однозначно показано, что актин содержится в ядрах клеток и участвует в реорганизации структуры хроматина и транскрипции.

В течение последних 50 лет понимание того, что представляет собой нативное состояние белка, как и за счет чего оно возникает, претерпело существенные изменения. Длительное время нативное состояние ассоциировалось с компактным глобулярным состоянием, а денатурированное — с полностью развернутым состоянием, напоминающим состояние клубка синтетических полимеров в хорошем растворителе. Способность глобулярных белков в нативном состоянии образовывать кристаллы подтверждает представление о том, что в нативном

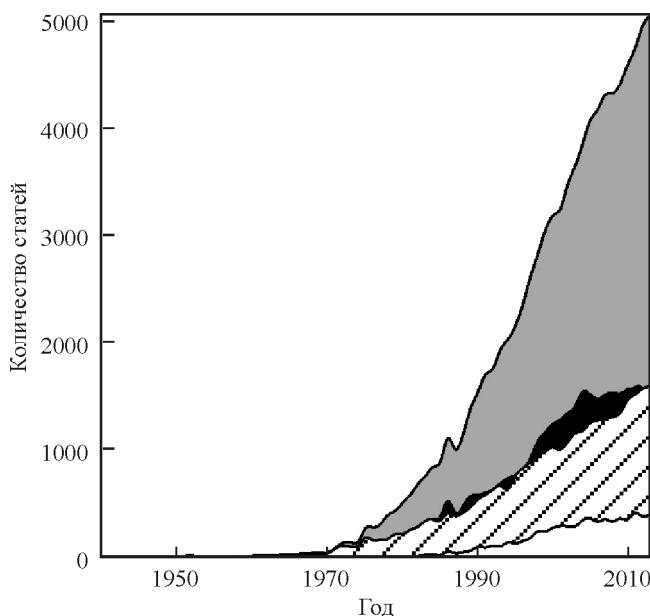


Рис. 1. Кривые роста количества публикаций, посвященных актину.

Показано изменение числа статей, посвященных мышечному (кривая, область под которой заштрихована), цитоплазматическому (кривая, область под которой окрашена в черный цвет) и ядерному (кривая, область под которой окрашена в белый цвет) актину, а также общего числа публикаций (кривая, область под которой окрашена в серый цвет).

состоянии белок имеет жесткую, строго упорядоченную структуру. Это позволило определить пространственную структуру многих тысяч белков (Dutta et al., 2009). Однако за последние 15 лет накопились данные, свидетельствующие о том, что многие белки не способны образовывать в водном растворе уникальную трехмерную структуру, но при этом могут выполнять присущие им функции (Uversky et al., 2008; Uversky, 2011). Было установлено, что эти белки приобретают упорядоченное компактное состояние в составе комплексов при взаимодействии с лигандами, другими белками или нуклеиновыми кислотами. В настоящее время такие белки чаще всего называют «внутренне неупорядоченными белками» (IDPs). Одной из отличительных особенностей IDPs является их способность к комплексообразованию с различными партнерами. Несспособность полипептидной цепи спонтанно принимать упорядоченную структуру также характерна для IDPs (Uversky et al., 2005; Uversky, 2011). Степень неупорядоченности в белках может быть разной, граница между глобулярными белками и IDPs условна (Туроверов и др., 2009). Многие белки, которые принято считать глобулярными, имеют неупорядоченные области.

Участвуя в многочисленных клеточных процессах в различных компартментах клетки, актин взаимодействует с большим числом партнеров (Uribe, Jay, 2009). Он не способен самостоятельно, без участия клеточных шаперонов, свернуться в нативную глобулярную структуру (Neirynck et al., 2006). Пространственная структура актина зависит от наличия АТФ и Ca^{2+} (Kabsch et al., 1990; Oetterbein et al., 2001), что также характерно для IDPs, многие из которых способны свернуться в трехмерную структуру только в присутствии своих лигандов. Таким образом, актин может быть отнесен к IDPs. С другой стороны, одной из функционально активных форм актина

является компактная глобула с четко определенной трехмерной структурой, так называемый G-актин.

Является актин глобулярным белком или IDP или он может быть классифицирован как гибридный белок, содержащий как упорядоченные, так и неупорядоченные области? Наш обзор посвящен поиску ответа на этот вопрос.

Структура актина

Актин — высококонсервативный белок с мол. массой 42 кДа, длина полипептидной цепи составляет 375 аминокислот (Oosawa, 1971). Существуют три изоформы актина, которые кодируются тремя различными генами, и каждая является полиморфным белком, способным к полимеризации. Изоформы актина различаются несколькими аминокислотными остатками, в основном на N-конце полипептидной цепи. Отличительной особенностью актина является его способность к полимеризации. При низкой ионной силе актин является мономером, в присутствии нейтральных солей он полимеризуется с образованием однонитевой спирали (фибриллярный, или F-актин). Отщепление катиона кальция (магния), входящего в состав актина, приводит к образованию I-актина, неспособного к полимеризации. Тенденция актина к полимеризации препятствует формированию кристаллов актина, которые необходимы для определения его пространственной структуры методом рентгеноструктурного анализа. Однако в комплексе с ДНКазой I или другими актинсвязывающими белками актин теряет способность к полимеризации. Впервые актин был кристаллизован в комплексе с ДНКазой I (Kabsch et al., 1990).

По данным рентгеноструктурного анализа, молекула актина, как и другие белки структурного суперсемейства, к которым помимо актина относятся гексокиназы и Hsp70, состоит из двух α/β -доменов (рис. 2, а). Каждый домен состоит из двух субдоменов. Общий размер молекулы актина составляет $55 \times 55 \times 35 \text{ \AA}$. Молекула актина содержит две щели — большую и малую. В большой щели расположены нековалентно связанная молекула АТФ (или АДФ) и один двухвалентный катион, которые стабилизируют глобулярную структуру белка. В последующем были определены структуры актина в комплексе с другими актин-связывающими белками. В настоящее время известно около 90 структур актина в комплексе с различными актинсвязывающими белками (Dutta et al., 2009).

Пространственная структура G-актина (рис. 2, а) практически не зависит от модификации, лиганда или нуклеотида (АТФ или АДФ), связанного с молекулой белка. Наибольшие различия встречаются в так называемой Д-петле, благодаря которой происходит образование комплекса актин—ДНКаза I. Кроме того, с участием этой петли происходит образование межмолекулярных контактов при образовании филамента F-актина. Д-петля локализована на «верхушке» субдомена II и содержит аминокислотные остатки 39—51. Любые аминокислотные замены в этой петле, даже если они не влияют на структуру субдомена II, приводят к потере способности актина к полимеризации. Интересно отметить, что вторичная структура Д-петли зависит от того, какой белок или лиганд входит в состав комплекса (рис. 2, б—г). Так, при определении структуры актина в комплексе с ДНКазой I было показано, что в состав Д-петли входит β -слой (Kabsch

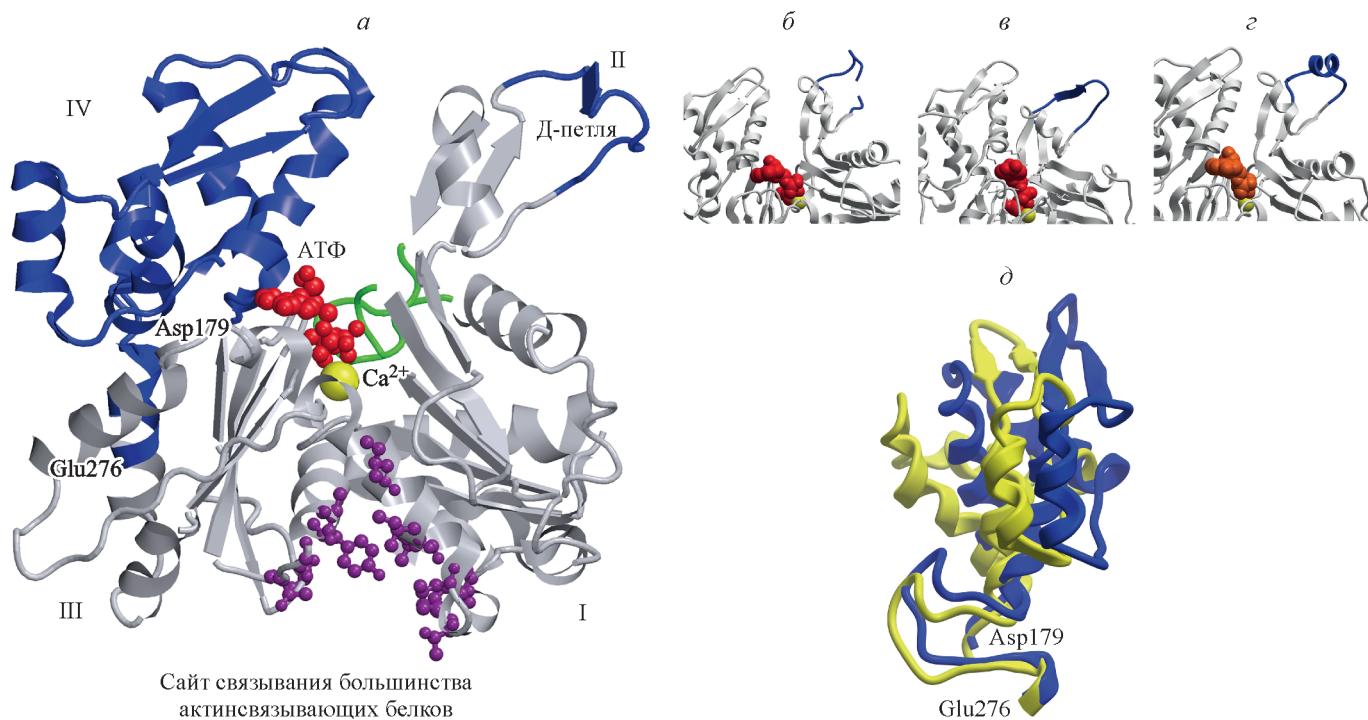


Рис. 2. Пространственная структура актина.

а — структура актина в комплексе с ДНКазой I (PDB ID: 1ATN (Kabsch et al., 1990)); римскими цифрами обозначены субдомены актина (I—IV). *б* — структура Д-петли актина в комплексе с сегментом I гельзолина (PDB ID: 3TU5 (Durer et al., 2012)). *в* — структура Д-петли актина в комплексе с ДНКазой I (PDB ID: 1ATN (Kabsch et al., 1990)). *г* — структура Д-петли актина в комплексе с тетраметилодамин-5-малеимидом (PDB ID: 116Z (Otterbein et al., 2001)). Синим цветом выделены Д-петля и субдомен IV, красным — АТФ, желтым — Ca^{2+} , фиолетовым — аминокислоты, взаимодействующие с актинсвязывающими белками, зеленым — петли, содержащие Ser14 и His37, оранжевым — АДФ; *д* — изменение положения субдомена IV при G-F трансформации актина. Структура субдомена IV G-актина (синий цвет, PDB ID: 1ATN (Kabsch et al., 1990)) и субъединицы F-актина (желтый цвет, PDB ID: 2ZWH (Oda, Maeda, 2010)). Рисунок построен на основе данных Protein Data Bank (Dutta et al., 2009). При подготовке рисунка использовали графические программы VMD (Humphrey et al., 1996) и Raster 3D (Merritt, Bacon, 1997).

et al., 1990), в комплексе с гельзолином в этой петле нет элементов вторичной структуры (McLaughlin et al., 1993), а в случае АДФ-актина в Д-петле формируется α -спираль (Otterbein et al., 2001).

Различия структур АТФ- и АДФ-актина незначительны и в основном затрагивают 2 петли, локализованные в субдомене I: петлю, содержащую Ser14 β -шпильку, и сенсорную петлю, имеющую в своем составе метилированный His74 (Graceffa, Dominguez, 2003). Несмотря на тот факт, что нуклеотидзависимые конформационные перестройки в этих петлях незначительны, они очень важны, так как взаимодействие актина с различными белками-партнерами актина регулируется нуклеотидом, входящим в состав комплекса. Так, профилин имеет большое сродство к АТФ-актину, а кофилин связывается с АДФ-актином с большей аффинностью, чем с АТФ-актином.

Субдомены I и III молекулы актина разделены малой щелью, элементы которой участвуют в формировании межмолекулярных контактов при полимеризации актина (рис. 2, *а*). Малая щель является местом связывания для большинства актинсвязывающих белков. Именно поэтому актин в комплексе с актинсвязывающими белками теряет способность к полимеризации.

Переход G-актина в F-актин сопровождается изменением положения субдомена IV относительно остальных трех субдоменов, приводящим к уплощению молекулы актина (рис. 2, *д*). Такая структурная перестройка способствует образованию межмолекулярных контактов между мономерами актина, входящими в состав F-актина. Долгое время считалось, что F-актин представляет собой пра-

возакрученную двойную спираль (Hanson, Lowy, 1963; Egelman, 1985). Однако на основе ранее определенной структуры G-актина методом рентгеноструктурного анализа было показано, что F-актин представляет собой одноцепочечную левозакрученную спираль, состоящую из 13 молекул G-актина на 6 поворотов спирали (Holmes et al., 1990; Lorenz et al., 1993). В дальнейшем структура F-актина была визуализирована с помощью метода электронной криомикроскопии (Fujii et al., 2010). Удивительно, но изображение F-актина в виде двойной спирали оказалось настолько впечатляющим, что многие исследователи до сих пор считают F-актин правозакрученной двухцепочечной спиралью (Dominguez, Holmes, 2011). Это заблуждение не так уж безобидно, так как в этом случае модель сборки и разборки актиновых нитей принципиально отличается от общепринятой.

Использование программы PONDR (Xue et al., 2010), разработанной для предсказания неупорядоченных участков полипептидной цепи по ее аминокислотной последовательности позволило нам найти несколько таких участков в структуре актина (рис. 3, аминокислотные остатки 1—6, 43—56, 98—115, 140—170, 201—208, 228—249, 300—317 и 364—375). Интересно, что некоторые из них совпадают с функциональными участками актина: Д-петля (39—51), аминокислотные остатки, участвующие во взаимодействии актина с актинсвязывающими белками и в образовании межмолекулярных контактов в F-актине (41—45, 166—169, 375), т. е., как и в случае IDPs, в состав актина входят функционально значимые внутренне неупорядоченные участки.

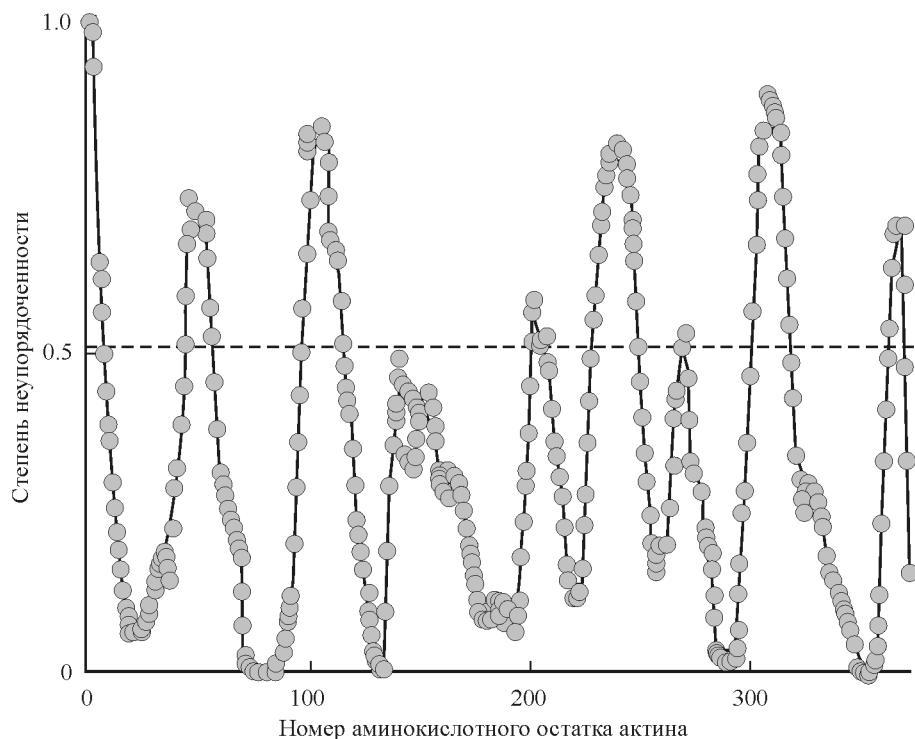


Рис. 3. Анализ аминокислотной последовательности актина с использованием программы PONDR-FIT (PONDR® VLXT) (Obra-dovic et al., 2005).

Согласно расчетам, аминокислотные остатки с рассчитанной величиной степени неупорядоченности больше 0.5 «стремятся быть неупорядоченными», т. е. формируют неструктурированные области белка.

Сворачивание—разворачивание актина

Первые исследования сворачивания—разворачивания актина, выполненные Лерером и Керваром (Lehrer, Kerwar, 1972), показали, что отщепление иона кальция при обработке актина ЭДТА или ЭГТА приводит к потере молекулой актина способности к полимеризации. Поскольку в этом состоянии актин функционально неактивен, это состояние было названо «инактивированным». I-актин может быть получен из нативного белка в результате тепловой денатурации, под воздействием умеренных концентраций мочевины или гуанидингидрохлорида (GdnHCl), при разведении или диализе из растворов 8 М мочевины или 6 М GdnHCl и даже спонтанно при длительном хранении препаратов (Kuznetsova et al., 1988). Начиная с работы Лерера и Кервара (Lehrer, Kerwar, 1972) и вплоть до конца XX в., было принято считать, что разворачивание нативного G-актина происходит через стадию образования I-актина (West et al., 1967; Lehrer, Kerwar, 1972; Contaxis et al., 1977; Татунашвили, Привалов, 1984; Bertazzon et al., 1990; Le Bihan, Gicquaud, 1993; Turoverov et al., 1999a):



где N — нативный G-актин, U — полностью развернутый актин.

Все равновесные зависимости, казалось бы, однозначно подтверждают эту модель. Спектр собственной флуоресценции I-актина с максимумом при длине волны 340 нм имеет промежуточное положение между спектрами нативного ($\lambda_{\max} = 325$ нм) и развернутого ($\lambda_{\max} =$

= 350 нм) белков (рис. 4, вставка). Длинноволновый сдвиг спектра обусловлен достаточно жестким полярным микроокружением триптофановых остатков, сформированных собственными аминокислотными остатками белка (Turoverov et al., 1999a, 1999b). Вторичная структура I-актина значительно разрушена (рис. 4). Изменения в спектре кругового дихроизма (КД) в дальней УФ-области при инактивации актина соответствуют частичной трансформации α -спиралей в неупорядоченные структуры или β -слои.

Появление новых элементов β -структур при денатурации белков доказано для ряда белков и часто коррелирует с ассоциацией или агрегацией их молекул (Fink, 1998). Спектры КД в дальней УФ-области I-актина, полученного под действием различных денатурирующих агентов, совпадают (рис. 4). Кроме того, инактивация актина сопровождается значительным увеличением величины анизотропии флуоресценции, что свидетельствует об уменьшении внутренней подвижности триптофановых остатков I-актина (Kuznetsova et al., 1988). I-актин отличается независимостью $1/r$ от T/η (Перреновская зависимость, где T и η — температура и вязкость раствора соответственно). Этот факт согласуется с предположением о том, что инактивация актина сопровождается ассоциацией частично свернутых молекул актина.

Предположение о том, что I-актин представляет собой специфический ассоциат, свойства которого не зависят от способа получения, было подтверждено методами гель-фильтрации и седиментации (Kuznetsova et al., 1999a). На основе анализа данных, полученных в ходе выполнения этих экспериментов, было сделано заключение о том, что I-актин представляет собой упорядочен-

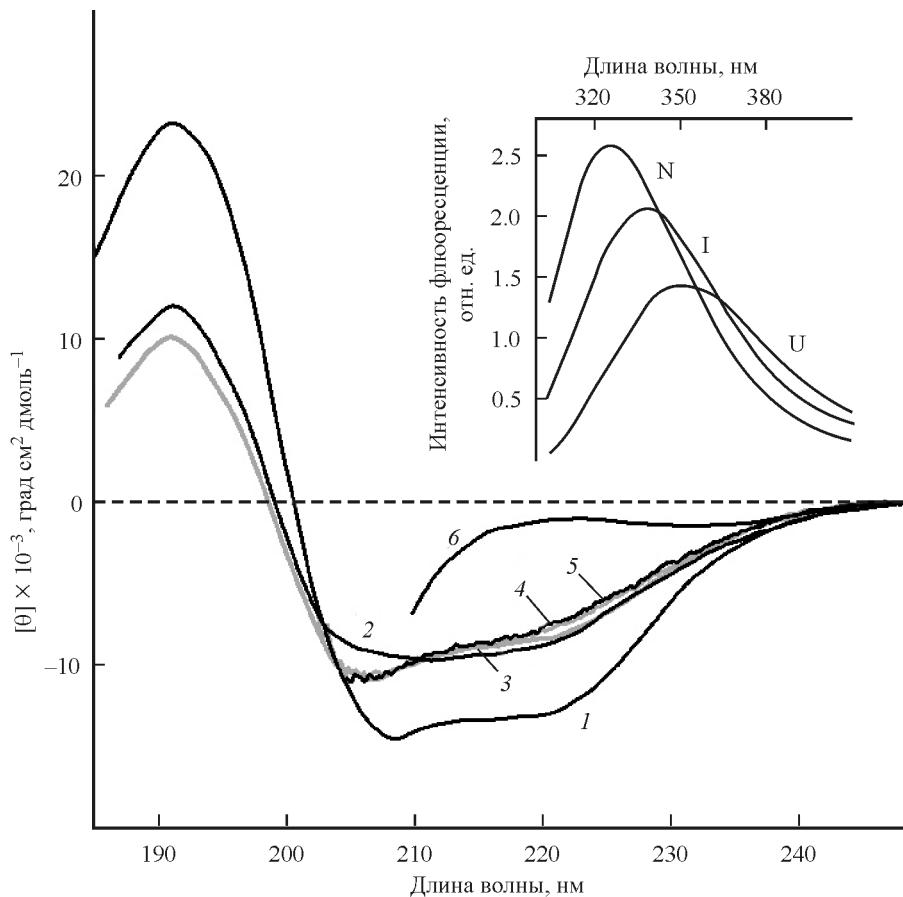
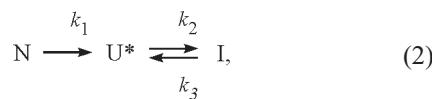


Рис. 4. Спектральные характеристики актина в разных структурных состояниях.

Спектры кругового дихроизма в дальней области нативного (кривая 1), инактивированного (зарегистрированы для инактивированного актина, полученного в результате нагревания (кривая 2), отщепления кальция ЭДТА (кривая 3), при добавлении в раствор актина GdnHCl (кривая 4) и мочевины (кривая 5)), а также полностью развернутого актина (кривая 6). Вставка: спектры собственной флуоресценции нативного (N), инактивированного (I) и полностью развернутого (U) актина. $\lambda_{\text{возб}} = 297 \text{ нм}$.

ный ассоциат — монодисперсный комплекс, состоящий из 14—16 частично свернутых мономеров актина (Kuznetsova et al., 1999b).

Для изучения процесса образования I-актина под действием GdnHCl были изучены кинетические кривые изменения параметров собственной флуоресценции (Kuznetsova et al., 2002; Turoverov et al., 2002). Наличие минимума на полученных кинетических кривых в области концентраций GdnHCl от 1 до 2 М свидетельствует о том, что переход от нативного к I-актину проходит через стадию образования существенно развернутого промежуточного интермедиата (U^* , рис. 5). На основании этих экспериментальных данных была предложена кинетическая схема разворачивания актина:



где k_i — константы скоростей соответствующих процессов, U^* — существенно развернутый кинетический интермедиат, флуоресцентные свойства которого сходны со свойствами полностью развернутого белка, но который в отличие от полностью развернутого актина сохраняет элементы вторичной структуры.

Исходя из зависимостей констант скоростей от концентрации GdnHCl можно определить условия, при кото-

рых можно зарегистрировать U^* . В области концентраций GdnHCl от 1 до 2 М константа скорости перехода от нативного белка к U^* превышает константу скорости образования I-актина. Это приводит к накоплению U^* на ранних стадиях в процессе денатурации и, как следствие, к появлению характерного минимума на кинетических кривых.

Кинетические зависимости интенсивности флуоресценции, измеренные при длинах волн 320 и 365 нм, использовали для построения параметрических зависимостей. В качестве параметра выступало время, прошедшее с момента смешивания раствора белка с раствором GdnHCl необходимой концентрации (рис. 5, б). Как видно на этом рисунке, характер параметрической зависимости при денатурации актина под действием 1.8 М GdnHCl однозначно свидетельствует о существовании U^* между нативным и I-актином. Точка на диаграмме, в которой пересекаются прямые, отвечающие процессу разворачивания нативного актина ($N \rightarrow U^*$) и процессу образования I-актина из существенно развернутого интермедиата ($U^* \rightarrow I$), характеризует U^* , флуоресцентные свойства которого отличаются от свойств полностью развернутым актином (Kuznetsova et al., 2002; Turoverov, Kuznetsova, 2003; Поварова и др., 2005; Povarova et al., 2007). Кроме того, параметрические зависимости, отвечающие процес-

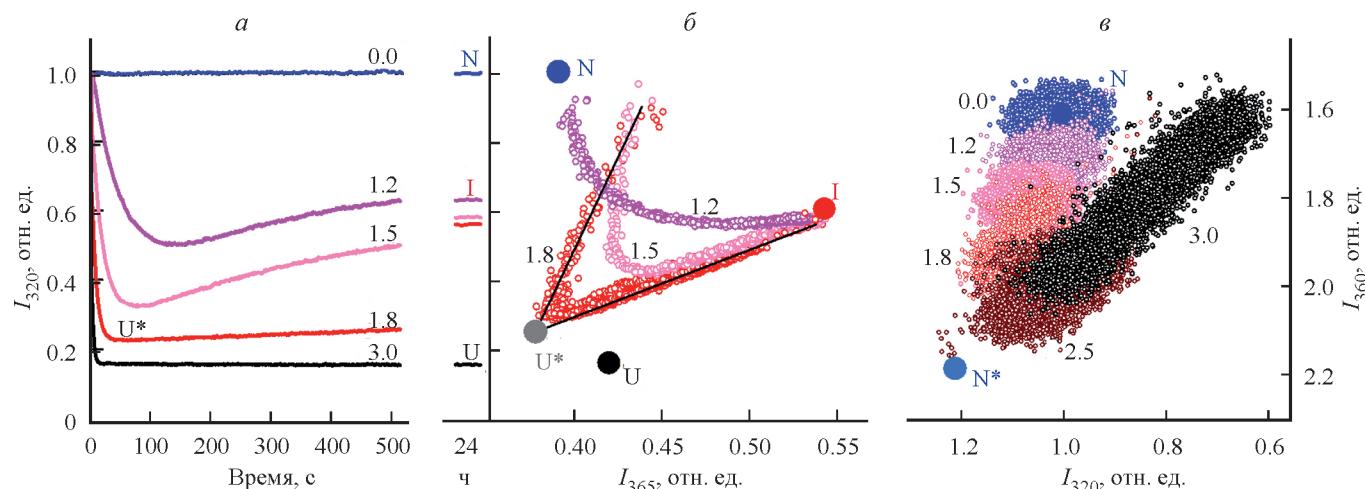


Рис. 5. Денатурация актина под действием GdnHCl.

a — кинетика денатурации актина под действием GdnHCl; здесь и далее цифры у кривых — концентрация GdnHCl, М, $\lambda_{\text{возд}} = 297 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{пер}} = 320 \text{ нм}$. *b* — параметрические зависимости между интенсивностью флуоресценции I_{320} и I_{365} , параметр — время, прошедшее после добавления к нативному актину растворов GdnHCl различной концентрации. Время усреднения сигнала 0.6 с. Большая часть экспериментальных точек соответствует первым 10 мин после перевода белка в раствор GdnHCl соответствующей концентрации. Конечные точки (символы большего размера) зарегистрированы после 24 ч инкубации. *c* — параметрические зависимости между интенсивностью флуоресценции I_{320} и I_{365} , параметр — время, прошедшее после добавления к нативному актину растворов GdnHCl различной концентрации. Время усреднения сигнала 0.6 с. Большая часть экспериментальных точек соответствует первым 4.8 с после перевода белка в раствор GdnHCl соответствующей концентрации.

сам разворачивания актина под воздействием GdnHCl различной концентрации, исходят не из одной точки, соответствующей нативному белку (N), а из разных точек. Это значит, что изменение раствора приводит к быстрым изменениям флуоресцентных свойств актина. Методом остановленного потока было доказано существование еще одного промежуточного состояния N* (рис. 5, в) (Поварова и др., 2005; Altschuler et al., 2005). Образование этого интермедиата предшествует образованию U* при денатурации актина ($N \rightarrow N^* \rightarrow U^* \rightarrow I$). Обратимость денатурации актина, установленная в ранних работах (Contaxis et al., 1977; Татунашвили, Привалов, 1984; De La Cruz, Pollard, 1995), нами не была доказана (Kuznetsova et al., 2002; Turoverov et al., 2002; Turoverov, Kuznetsova, 2003; Поварова и др., 2005).

Ион кальция играет важную роль в необратимости процесса денатурации актина: нативная структура становится энергетически выгодной только при наличии кальция в структуре, в противном случае структура стабилизируется межмолекулярными контактами, которые приводят к образованию I-актина. Поэтому наличие шаперонов является необходимым условием для фолдинга актина.

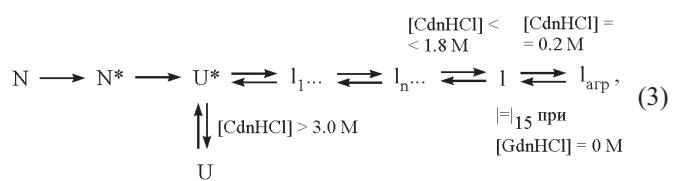
Разворачивание актина под действием 4 М GdnHCl также проходит с образованием промежуточных интермедиатов N^* и U^* . Константы скоростей реакций $N \rightarrow N^*$, $N^* \rightarrow U^*$ и $U^* \rightarrow U$ увеличиваются с увеличением концентрации GdnHCl. В 4 М GdnHCl эти значения очень велики, и поэтому создается впечатление, что разворачивание актина в этом растворе — одностадийный процесс. Ион кальция стабилизирует структуру актина, как и другие лиганды стабилизируют структуры белков, с которыми они образуют комплекс. Следовательно, отщепление кальция можно рассматривать как триггер, запускающий каскад конформационных изменений, т. е. образование кинетических интермедиатов.

Диссоциация кальция в растворах с низким содержанием GdnHCl является медленным процессом (Kuznetsova et al., 2002). Молекулы актина, перешедшие в существенно развернутое состояние, быстро ассоциируют, обра-

зуя I-актина, потому что константа скорости процесса $U^* \rightarrow I$ в отсутствие денатуранта велика. Это и является причиной спонтанной инактивации актина при хранении препаратов (Kuznetsova et al., 1988). В то же время тот же самый процесс под действием ЭДТА протекает очень быстро: константа скорости реакции $N \rightarrow N^*$ очень велика, и, как уже упоминалось, в отсутствие GdnHCl константа реакции $U^* \rightarrow I$ тоже очень большая. Именно поэтому кажется, что разворачивание актина под действием ЭДТА — одностадийный процесс: $N \rightarrow I$; фактически же это многостадийный процесс: $N \rightarrow N^* \rightarrow U^* \rightarrow I$.

При высоких температурах ($60-70^{\circ}\text{C}$) разворачивание актина, казалось бы, происходит по принципу «все или ничего»: $\text{N} \rightarrow \text{I}$. На самом деле, как и в случае денатурации актина ЭДТА, это многостадийный процесс: $\text{N} \rightarrow \text{N}^* \rightarrow \text{U}^* \rightarrow \text{I}$. Но в случае тепловой денатурации константы скоростей первых двух процессов ($\text{N} \rightarrow \text{N}^* \rightarrow \text{U}^*$) малы, в то время как образование I-актина из U^* протекает очень быстро.

Исследование процессов сворачивания—разворачивания актина, а также данные, полученные нами для других белков, позволили сделать заключение о том, что пути разворачивания, количество и порядок формирования промежуточных состояний не зависят от способа денатурации. На основании полученных экспериментальных данных нами была предложена новая кинетическая схема сворачивания—разворачивания актина под действием GdnHCl :



где $I_{\text{агр}}$ — агрегаты I-актина.

Согласно этой схеме, образование U^* из нативного актина происходит через стадию образования кинетиче-

ского интермедиата N^* на ранних стадиях разворачивания нативного актина. В то же время образование U^* предшествует образованию I-актина. Таким образом, обнаруженные кинетические интермедиаты N^* и U^* являются промежуточными состояниями на пути сворачивания—разворачивания актина.

Агрегаты I-актина образуются в результате воздействия GdnHCl в небольшой концентрации. Нами было обнаружено, что зависимость интенсивности флуоресценции 1-анилинонафталин-8-сульфоната (АНС) в растворах I-актина от концентрации GdnHCl имеет ярко выраженный максимум (рис. 6, а). При той же концентрации GdnHCl наблюдается и максимум светорассеяния (рис. 6, б). В то же время эти характеристики не изменяются при добавлении в раствор I-актина мочевины до концентрации, при которой I-актин начинает распадаться на мономеры и разворачиваться. Это свидетельствует о том, что в этой области концентраций GdnHCl образуются большие агрегаты I-актина. Агрегация I-актина при низких концентрациях GdnHCl приводит к существенному увеличению числа гидрофобных карманов и, как следствие, к увеличению количества связанных с белком молекул АНС, что в свою очередь приводит к увеличению интенсивности флуоресценции АНС.

Агрегация белка объясняется взаимодействием катионов гуанидина (GuH^+) с группами C=O боковых цепей глутаминовой и аспарагиновой кислот, локализованными на поверхности актина. Такое взаимодействие было показано ранее (Ануфриева и др., 1994; Mason et al., 2004). Молекула актина при нейтральных рН заряжена отрицательно ($pI = 5.07$; рис. 6, б, вставка). С ростом числа ионов GuH^+ , связанных с белком, увеличивается количество положительных групп на поверхности белка, и при некоторой концентрации GdnHCl (0.25 М) в целом исходно отрицательно заряженная макромолекула актина становится нейтральной. При этом создаются условия для ассоциации макромолекул актина между собой. 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. I-актин — очень удачный объект для исследований агрегирующего действия GdnHCl, поскольку является достаточно крупным образованием (Kuznetsova et al., 1998, 1999а, 2002).

Детальное исследование процессов сворачивания—разворачивания актина — один из основных информативных подходов для выяснения того, к какому классу белков относится актин, является ли он глобулярным белком или IDP. Отщепление Ca^{2+} при обработке актина ЭДТА различными денатурирующими агентами (мочевиной, GdnHCl и пр.) или при изменении рН раствора приводит к образованию I-актина. Удаление денатурирующих агентов из растворов полностью развернутого или I-актина также сопровождается образованием (сохранением) инактивированного состояния. Следовательно, I-актин является термодинамически стабильной формой белка, информация о которой закодирована в аминокислотной последовательности актина. Считается, что I-актин — это функционально неактивная форма белка. Возможно, что это утверждение неверно и I-актин выполняет некие функции в клетке, о которых пока неизвестно.

G-актин с этой точки зрения является квазистационарной, термодинамически нестабильной формой белка.

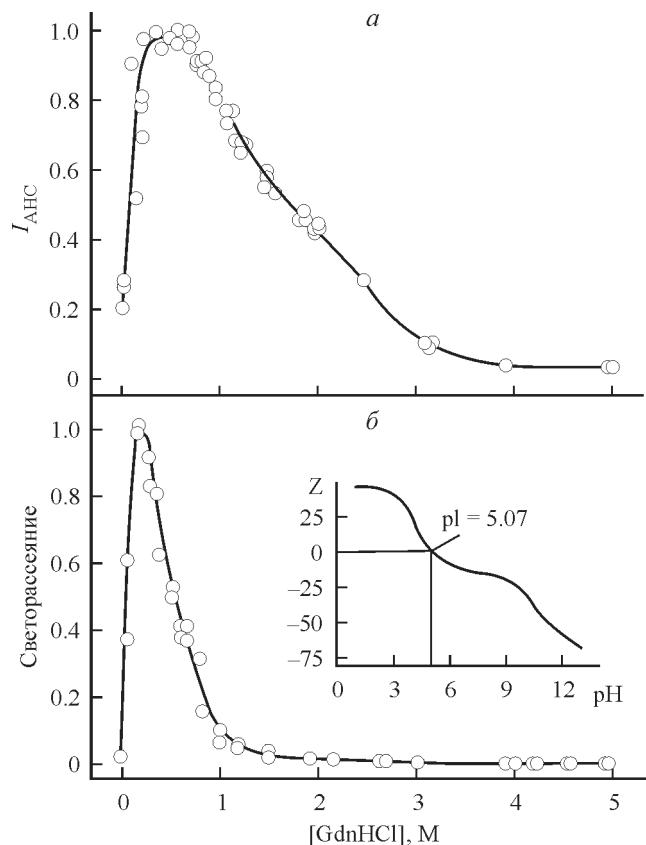


Рис. 6. Взаимодействие исходно инактивированного актина с GdnHCl.

а — зависимость интенсивности флуоресценции АНС ($I_{\text{АНС}}$) от концентрации GdnHCl в растворах исходно инактивированного актина. $\lambda_{\text{возб}} = 365 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{пер}} = 480 \text{ нм}$. б — зависимость светорассеяния от концентрации GdnHCl в растворах исходно инактивированного актина. $\lambda_{\text{возб}} = \lambda_{\text{пер}} = 365 \text{ нм}$

Белок переходит в данное псевдостационарное состояние в результате сложного процесса фолдинга, контролируемого с помощью ряда белков, таких как шаперон Hsp70, префолдин и шаперонин CCT. Структура G-актина зависит от наличия лигандов — Mg^{2+} и АТФ.

По всей видимости, квазистационарные состояния белков распространены в природе. Существование таких состояний определяется степенью внутренней неупорядоченности белка, полипептидная цепь которого неспособна формировать глобулярную трехмерную структуру без взаимодействия со своими природными лигандами, т. е. образование квазистационарного нативного состояния — процесс энергоемкий из-за невозможности самопроизвольного фолдинга полипептидной цепи, участия в нем сложной клеточной машинерии для белкового фолдинга и взаимодействия со своими природными лигандами — ионами металлов, АТФ и другими молекулами.

Сворачивание актина *in vivo*

Денатурация актина необратима, поэтому наличие шаперонов является, по-видимому, необходимым требованием для сворачивания актина. Шапероны — обширное семейство белков с различной молекулярной массой, структурой и функциями. Наиболее существенную роль при фолдинге белков в клетках эукариот играют два

класса АТФ-зависимых шаперонов — Hsp70 и шаперонины. Hsp70 при содействии кошаперонов семейства DnaJ/Hsp40 связываются с небольшими гидрофобными участками полипептидной цепи сразу после биосинтеза (Feldman, Frydman, 2000). Это взаимодействие не является избирательным, поскольку кластеры гидрофобных аминокислот существуют практически у любой развернутой полипептидной цепи. Основная роль Hsp70, по-видимому, состоит в предотвращении нежелательных взаимодействий вновь синтезируемой полипептидной цепи с другими молекулами, что могло бы приводить к агрегации. Для некоторых белков взаимодействие с Hsp70 оказывается достаточным для правильного сворачивания, однако для мультидоменных белков требуется участие и других «помощников». Например, для сворачивания актина необходимо его взаимодействие с префолдином, который участвует в транслокации частично свернутой цепи актина к шаперонину CCT. CCT состоит из двух наложенных друг на друга тороидов, каждый из которых состоит из восьми трехдоменных белков. Экваториальные домены осуществляют связь между тороидами и взаимодействие с АТФ, а апикальные домены — связь с субстратом и прохождение субстрата в полость цилиндра, образованного этими тороидами. Показано, что фолдинг актина является многоступенчатым АТФ- зависимым процессом, контролируемым CCT (Neigupsk et al., 2006; Altschuler, Willison, 2008). Непосредственное участие префолдина и CCT в сворачивании актина делает невозможным экспрессию рекомбинантного актина в *Escherichia coli* и позволяет экспрессировать рекомбинантный актин в дрожжах (Karlsson, 1988; Verkhusha et al., 2003). Рефолдинг актина, денатурированного ЭДТА в присутствии CCT *in vitro*, был показан в работе Альтшулера и соавторов (Altschuler et al., 2005).

Аминокислотная последовательность актина такова, что он не может свернуться в компактное глобулярное состояние без помощи шаперонов. Несмотря на существенную роль шаперонов в фолдинге глобулярных белков *in vivo*, они не несут той структурной информации, которая необходима вновь синтезируемой полипептидной цепи для приобретения ею жесткой глобулярной нативной структуры. По-видимому, еще большее значение для фолдинга и функционирования имеют взаимодействия с шаперонами и другими белками-партнерами для частично или полностью неупорядоченных белков. Такие взаимодействия должны предохранять эти белки от агрегации и протеолиза.

Локализация и функции актина в клетке

Несмотря на то что актин есть в каждой эукариотической клетке, наиболее богаты актином мышечные клетки, которые почти полностью состоят из актомиозиновых волокон. Поэтому неудивительно, что впервые актин был получен именно из мышечных клеток. Это научно-историческое событие произошло в лаборатории, возглавляемой Бруно Штраубом, где изучалось явление мышечного сокращения (Straub, 1942). Штрауб показал, что выделенный им белок способен активировать мышечные сокращения, поэтому назвал его «актином».

Мышечное сокращение изучено уже всесторонне. И чем детальнее оно изучалось, тем более очевидной становилась роль актина не только в активации этого процесса, но и в управлении и организации других сложных

процессов, протекающих с участием множества белков. Эта большая группа белков была названа актинсвязывающими белками.

В мышцах актин существует в F-форме. Однажды полимеризовавшись, актин встраивается в мышечное волокно и не деполимеризуется до тех пор, пока мышца не будет разрушена. Таким образом, G-актин необходим только в случае роста или репарации мышц.

Помимо того, что актин является основной составляющей мышечных клеток, он является важным компонентом цитоскелета всех эукариотических клеток. Этот белок играет ключевую роль в формировании и поддержании морфологии и полярности клетки, в эндоцитозе и внутриклеточном транспорте, в сокращаемости, подвижности и делении клеток. Все эти функции основаны на высокоупорядоченных процессах сборки и разборки филаментов и полимеризации-деполимеризации F-актина. Эти процессы регулируются рядом актинсвязывающих белков, которые в свою очередь находятся под контролем специфических сигнальных путей (Dos Remedios et al., 2003; Maciver, 2004).

Первым важным этапом полимеризации является фаза «зарождения», когда происходит образование ядра полимеризации, состоящего из трех мономеров актина. Скорость полимеризации ограничена этой фазой. Основными участниками этой фазы являются белки-формины, комплекс Arp2/3, Spire, Cobl, TARP и Lmod (Winder, Ayscough, 2005). В большинстве этих белков, за исключением форминов, находится так называемый домен WH2 (WASP homology 2 domain), содержащий 17—27 аминокислотных остатков. Два WH2-домена в tandemе, связанные с 3 (иногда 4) молекулами актина образуют ядро полимеризации актина.

Формины содержат по два высококонсервативных домена — FH1 и FH2, контролирующих процесс полимеризации актина. Предполагается, что домен FH2 стабилизирует димер актина, этот комплекс получил название «раннее ядро полимеризации». Обогащенный пролином, домен FH1 взаимодействует с актинсвязывающим белком профилином, который доставляет мономер актина к растущему концу филамента.

Комплекс Arp2/3 включает в себя 7 белков (Arp2, Arp3 и ARPC1—ARPC5) с мол. массами от 16 до 47 кДа. Белки Arp2 и Arp3 имеют структуру, сходную со структурой G-актина, и когда комплекс Arp2/3 связывается с актином, считается, что образовалось ядро для дальнейшей полимеризации актина. В процессе дальнейшего роста нити комплекс Arp2/3 играет роль кэпирующего белка на одном из концов филамента. Связываясь с боковыми поверхностями актиновых филаментов, Arp2/3 способен инициировать ветвление уже имеющихся нитей. Комплекс Arp2/3 также регулирует рост и вытягивание ламеллоподий (дихотомически ветвящихся структур на переднем крае движущихся клеток) (Pollard, Borisy, 2003).

В процессе полимеризации участвуют и другие белки, регулируя рост филамента (Paavilainen et al., 2004): например, гельзолин и тензин регулируют терминацию роста филамента. Эти белки связываются с растущим концом филамента и тем самым блокируют присоединение новых мономеров. Гельзолин также участвует в разрыве филаментов (Burtnick et al., 2004), в то время как тропомиозины (высококонсервативное семейство актинсвязывающих белков) связываются с филаментом, предотвращая спонтанную деполимеризацию и расщепление актиновых нитей гельзолином. Кроме того, существуют

актингвязывающие белки, участвующие в детерминации длины филамента. Данные белки содержат домены, позволяющие им взаимодействовать с белками сигнальной сети клетки. Это взаимодействие позволяет актиновому цитоскелету перестраиваться в нужное время и в нужном месте. К таким белкам относится небулин — белок с многочисленными актингвязывающими сайтами с низкими константами связывания (Winder, Ayscough, 2005).

В случае если актиновый филамент разрушен, F-актин должен быть деполимеризован. Среди белков, регулирующих деполимеризацию актина, наиболее хорошо изучены белки, относящиеся к АДФ-кофилиновым низкомолекулярным актингвязывающим белкам (Winder, Ayscough, 2005). После деполимеризации актина в качестве его лиганда выступает АДФ. С АДФ-актином, высвобожденным с конца филамента, связываются актингвязывающие белки, способствующие обмену АДФ на АТФ (например, профилин, CAP) и доставке АТФ-актина к растущему концу филамента, содействуя новому раунду полимеризации (например, профилин, твинфилин, верпролин/WIP, WASP).

Для быстрого роста филаментов в клетках должно быть достаточно большое количество АТФ-актина, готового к полимеризации, но находящегося в глобулярной форме до тех пор, пока не будет дан нужный сигнал. Для этих целей существуют специальный класс актингвязывающих белков, из которых наиболее хорошо изучены белки, относящиеся к семейству тимозинов. Специальный сигнал запускает активацию профилина, что приводит к отщеплению тимозина от актина и высвобождению большого количества АТФ-актина, готового к полимеризации (Hertzog et al., 2004). F-актин также взаимодействует со многими актингвязывающими белками, которые не влияют на его структуру и динамику. К ним относятся миозины, использующие актин в качестве рельса, вдоль которого двигаются цитосклетные линкеры (дистрофин, утрофин, винкулин), соединяющие различные элементы цитоскелета, и белки (аннексины), взаимодействующие одновременно с актином и с мембраной (Winder, Ayscough, 2005).

Ядерный актин был открыт практически в одно время с цитоплазматическим (Lane, 1969), но был признан артефактом. Детальное изучение ядерного актина началось не так давно. В настоящее время доказано наличие актина в ядре (Vartiainen et al., 2007), где он является важным регулятором транскрипции (Miralles, Visa, 2006), активности транскрипционных факторов (Vartiainen et al., 2007) и реорганизации структуры хроматина (Zheng et al., 2009). Ядерный актин изучен не так хорошо, как цитоплазматический. Существование F-актина в ядрах до сих пор строго не доказано, поскольку он не окрашивается его маркером фаллоидином (Visegrady et al., 2005). Однако в ядрах обнаружены все актингвязывающие белки, взаимодействующие с F-актином (Gonsior et al., 1999), а латринкулин, расщепляющий F-актин на мономеры, ингибитирует ряд ядерных актингзависимых функций, включая экспорт РНК и белков, сборку ядерной оболочки, транскрипцию, межхромосомные взаимодействия, вызванные транскрипцией (Hofmann et al., 2001; Krauss et al., 2003; McDonald et al., 2006; Nunez et al., 2008). Эти данные являются непрямым доказательством того, что актин в ядре должен быть в полимеризованной форме.

Опубликован ряд работ, в которых авторы пытались доказать существование филаментов актина в ядре, но наиболее убедительным и интересным является микро-

скопическое исследование, выполненное в 2006 г. (McDonald et al., 2006). Авторы показали, что приблизительно 20 % всего пула ядерного актина находится в полимеризованной форме. Неудача в экспериментах с фаллоидином объясняется малой концентрацией F-актина в ядре по сравнению с цитозолем (ядро содержит около 1 % всего актина клетки), его маскированием актингвязывающими белками и, возможно, меньшей длиной (McGough et al., 1997; Vartiainen, 2008).

Интересно, что функциональная форма актина в мышечных клетках, а также в цитоплазме и ядре других типов клеток разная. В мышцах, однажды сформировавшихся, филаменты не разрушаются и новые нити появляются только во время роста мышц или при reparации, т. е. основная функциональная форма — F-актин. В цитоплазме немышечных клеток актиновые фибриллы собираются и разбираются. Клеточная подвижность также основана на полимеризации и деполимеризации актина. Таким образом, достаточно большое количество мономеров актина должно храниться в цитоплазме для поддержки эффективной функции актина. В ядре важную роль играют мономеры актина. Пул мономеров актина участвует в контроле экспрессии многих белков, которые сами по себе являются компонентами актинового цитоскелета (Miralles, Visa, 2006).

Актин — многофункциональный белок, взаимодействующий с большим числом партнеров. На рис. 7, a представлены результаты анализа взаимодействий α -актина человека с использованием базы данных STRING. Для сравнения на этом же рисунке представлены результаты аналогичного анализа для глобулярного белка — карбонгидразы 6 человека — и внутренне неупорядоченного хаб-белка α -синуклеина человека. Хаб-белок — белок, взаимодействующий со многими другими белками,узел в сети белок-белковых взаимодействий. Очевидно, что по количеству белков-партнеров актин можно рассматривать в качестве хаб-белка, как и α -синуклеин.

Термодинамически стабильное состояние: G- или I-актин

Актин имеет много особенностей, характерных для IDPs, например он не может свернуться без помощи шаперонов, без лигандов, кальция и АТФ. Т. е. информации, содержащейся в его полипептидной цепи, недостаточно для сворачивания или возникающих при фолдинге внутримолекулярных контактов недостаточно для того, чтобы полипептидная цепь свернулась самостоятельно, без шаперонов, а также для поддержания нативной структуры без закрепления ее ионами кальция. Актин всегда существует в комплексе: во время фолдинга он взаимодействует сначала с шапероном Hsp70, затем с префолдином и, наконец, с шаперонином CCT, который обеспечивает правильный фолдинг и встраивание иона кальция и молекулы АТФ; F-актин формируется в результате самоассоциации молекул G-актина; I-актин представляет собой монодисперсный комплекс (не аморфный агрегат) и, возможно, сам тоже является функциональной структурной единицей; в цитоплазме и ядрах актин находится в комплексе с актингвязывающими белками, в частности пул G-актина поддерживается в комплексе с профилином. Актин имеет несколько сайтов связывания и может взаимодействовать с большим числом партнеров. Взаимодействуя с рядом актингвязывающих белков, актин действу-

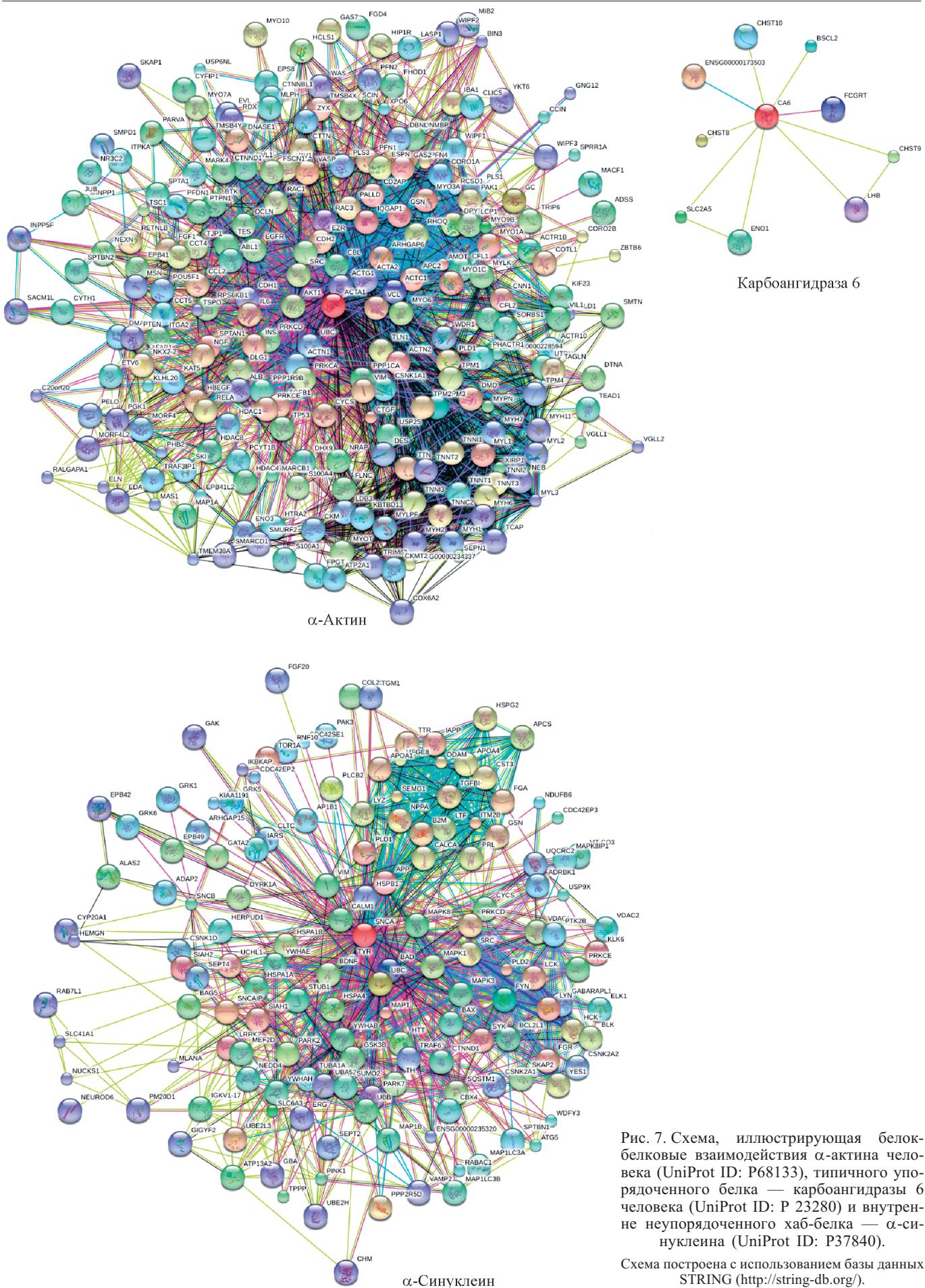


Рис. 7. Схема, иллюстрирующая белок-белковые взаимодействия α -актина человека (UniProt ID: P68133), типичного упорядоченного белка — карбоангидразы 6 человека (UniProt ID: P 23280) и внутренне неупорядоченного хаб-белка — α -субъединицы нуклеина (UniProt ID: P37840).

ет как хаб-белок, что типично для IDPs. Многие из актингвязывающих белков сами по себе являются IDPs сигнальной системы и взаимодействуют с другими хаб-белками.

С другой стороны, актин существенно отличается от IDPs, так как апобелок не может существовать в мономерной форме. Актин при отщеплении своих лигандов и партнеров не только разворачивается, но и олигомеризуется, образуя в результате I-актин. Денатурация актина — необратимый процесс, приводящий к образованию I-актина. G-актин является белком с квазистационарной структурой. Информации, закодированной в его аминокислотной последовательности, недостаточно для фолдинга в глобулярное, функционально-активное состояние с уникальной трехмерной структурой. I-актин, образующийся в результате рефолдинга *in vitro*, является термодинамически стабильным состоянием, информация о котором заложена в его аминокислотной последовательности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-24-00131).

Список литературы

- Ануфриева Е. В., Некрасова Т. Н., Шевелева Т. В., Краковяк М. Г. 1994. Строение и структурные превращения макромолекул водорастворимых полимеров и люминесценция магниевой соли 8-анилинонафталин-1-сульфокислоты. Высокомолекуляр. соед. 36 (3) : 449—456. (Anufrieva E. V., Nekrasova T. N., Sheveleva T. V., Krakovyak M. G. 1994. Structure and structural transformations of macromolecules water-soluble polymers and luminescence of magnesium salt of 8-anilinenaphthalene-1-sulfonic acid. Vysokomol. Soed. 36 : 449—456.)
- Поварова О. И., Кузнецова И. М., Туроверов К. К. 2005. Физико-химические свойства актина в различных структурных состояниях. Новые представления о процессах его сворачивания-разворачивания. Цитология. 47 (11) : 953—977. (Povarova O. I., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K. 2005. Physical-chemical properties of actin in different structural states. New ideas about its folding—unfolding pathways. Tsitologiya. 47 (11) : 953—977.)
- Татунашвили Л. В., Привалов П. Л. 1984. Калориметрическое исследование денатурации G-актина. Биофизика. 29 (4) : 583—585. (Tatunashvili L. V., Privalov P. L. 1984. Calorimetric study of G-actin denaturation. Biophysika. 29 (4) : 583—585.)
- Туроверов К. К., Уверский В. Н., Кузнецова И. М. 2009. Нативные глобулярные и нативные частично или полностью неупорядоченные белки. Фолдинг, образование надмолекулярных комплексов, агрегация. Цитология. 51 (3) : 190—203. (Turoverov K. K., Uversky V. N., Kuznetsova I. M. 2009. Native globular and native partially or completely disordered proteins. Folding, supramolecular complex formation and aggregation. Tsitologiya. 51 (3) : 190—203.)
- Altschuler G. M., Klug D. R., Willison K. R. 2005. Unfolding energetics of G-alpha-actin: a discrete intermediate can be re-folded to the native state by CCT. J. Mol. Biol. 353 : 385—396.
- Altschuler G. M., Willison K. R. 2008. Development of free-energy-based models for chaperonin containing TCP-1 mediated folding of actin. J. R. Soc. Interface. 5 : 1391—1408.
- 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 effects of calcium. Biochemistry. 29 : 291—298.
- Burtnick L. D., Urosev D., Irobi E., Narayan K., Robinson R. C. 2004. Structure of the N-terminal half of gelsolin bound to actin: roles in severing, apoptosis and FAF. EMBO J. 23 : 2713—2722.
- Contaxis C. C., Bigelow C. C., Zarkadas C. G. 1977. The thermal denaturation of bovine cardiac G-actin. Can. J. Biochem. 55 : 325—331.
- De La Cruz E. M., Pollard T. D. 1995. Nucleotide-free actin: stabilization by sucrose and nucleotide binding kinetics. Biochemistry. 34 : 5452—5461.
- Dominguez R., Holmes K. C. 2011. Actin structure and function. Annu. Rev. Biophys. 40 : 169—186.
- Dos Remedios C. G., Chhabra D., Kekic M., Dedova I. V., Tsubakihara M., Berry D. A., Nosworthy N. J. 2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. Physiol. Rev. 83 : 433—473.
- Durer Z. A., Kudryashov D. S., Sawaya M. R., Altenbach C., Hubbell W., Reisler E. 2012. Structural states and dynamics of the D-loop in actin. Biophys. J. 103 : 930—939.
- Dutta S., Burkhardt K., Young J., Swaminathan G., Matsuurra T., Henrick K., Nakamura H., Berman H. 2009. Data deposition and annotation at the worldwide protein data bank. Mol. Biotechnol. 42 : 1—13.
- Egelman E. H. 1985. The structure of F-actin. J. Muscle Res. Cell Motil. 6 : 129—151.
- Feldman D. E., Frydman J. 2000. Protein folding *in vivo*: the importance of molecular chaperones. Curr. Opin. Struct. Biol. 10 : 26—33.
- Fink A. L. 1998. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. Fold. Des. 3 : R9—R23.
- Fujii T., Iwane A. H., Yanagida T., Namba K. 2010. Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy. Nature. 467 : 724—728.
- Gonsior S. M., Platz S., Buchmeier S., Scheer U., Jockusch B. M., Hinsen H. 1999. Conformational difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by a monoclonal antibody. J. Cell Sci. 112 : 797—809.
- Graceffa P., Dominguez R. 2003. Crystal structure of monomeric actin in the ATP state. Structural basis of nucleotide-dependent actin dynamics. J. Biol. Chem. 278 : 34 172—34 180.
- Hanson J., Lowy J. 1963. The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle. J. Mol. Biol. 6 : 46—60.
- Hertzog M., van Heijenoort C., Didry D., Gaudier M., Coutant J., Gigant B., Didelot G., Preat T., Knossow M., Guittet E., Carlier M. F. 2004. The beta-thymosin/WH2 domain; structural basis for the switch from inhibition to promotion of actin assembly. Cell. 117 : 611—623.
- Hofmann W., Reichart B., Ewald A., Muller E., Schmitt I., Stuber R. H., Lottspeich F., Jockusch B. M., Scheer U., Hauber J., Dabauvalle M. C. 2001. Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. J. Cell Biol. 152 : 895—910.
- Holmes K. C., Popp D., Gebhard W., Kabsch W. 1990. Atomic model of the actin filament. Nature. 347 : 44—49.
- Humphrey W., Dalke A., Schulter K. 1996. VMD: visual molecular dynamics. J. Mol. Graph. 14 : 33—38.
- Kabsch W., Mannherz H. G., Suck D., Pai E. F., Holmes K. C. 1990. Atomic structure of the actin: DNase I complex. Nature. 347 : 37—44.
- Karlsson R. 1988. Expression of chicken beta-actin in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene. 68 : 249—257.
- Krauss S. W., Chen C., Penman S., Heald R. 2003. Nuclear actin and protein 4.1: essential interactions during nuclear assembly *in vitro*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100 : 10 752—10 757.
- Kuznetsova I. M., Biktashev A. G., Khaitlina S. Y., 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., Konditerov S. N., Surin A. M., Turoverov K. K. 1988. Changes of structure and intramolecular mobility in the course of actin denaturation. Biophys. Chem. 32 : 73—78.
- Kuznetsova I. M., Khaitlina S. Y., Turoverov K. K. 1998. Structural properties of inactivated actin: an intermediate form in the folding—unfolding of actin. Bioorganic Chem. 24 : 783—791.
- Kuznetsova I. M., Stepanenko O. V., Stepanenko O. V., Povarova O. I., Biktashev A. G., Verkhusha V. V., Shavlovsky M. M., Turoverov K. K. 2002. The place of inactivated actin and its kinetic

- predecessor in actin folding—unfolding. *Biochemistry*. 41 : 13 127—13 132.
- 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.
- Lane N. J.* 1969. Intranuclear fibrillar bodies in actinomycin D-treated oocytes. *J. Cell Biol.* 40 : 286—291.
- 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. S., Kerwar G.* 1972. Intrinsic fluorescence of actin. *Biochemistry*. 11 : 1211—1217.
- Lorenz M., Popp D., Holmes K. C.* 1993. Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm. *J. Mol. Biol.* 234 : 826—836.
- Maciver C. K.* 2004. The Encyclopaedia of actin-binding proteins and drugs. <http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smacierver/Encyclop/encycloABP.html>
- Mason P. E., Neilson G. W., Enderby J. E., Saboungi M. L., Dempsey C. E., MacKerell A. D., jr., Brady J. W.* 2004. The structure of aqueous guanidinium chloride solutions. *J. Amer. Chem. Soc.* 126 : 11 462—11 470.
- McDonald D., Carrero G., Andrin C., de Vries G., Henzel M. J.* 2006. Nucleoplasmic beta-actin exists in a dynamic equilibrium between low-mobility polymeric species and rapidly diffusing populations. *J. Cell Biol.* 172 : 541—552.
- McGough A., Pope B., Chiu W., Weeds A.* 1997. Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J. Cell Biol.* 138 : 771—781.
- 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.
- Merritt E. A., Bacon D. J.* 1997. Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Methods Enzymol.* 277 : 505—524.
- Miralles F., Visa N.* 2006. Actin in transcription and transcription regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18 : 261—266.
- Neirynck K., Waterschoot D., Vandekerckhove J., Ampe C., Rommelaere H.* 2006. Actin interacts with CCT via discrete binding sites: a binding transition-release model for CCT-mediated actin folding. *J. Mol. Biol.* 355 : 124—138.
- Nunez E., Kwon Y. S., Hutt K. R., Hu Q., Cardamone M. D., Ohgi K. A., Garcia-Bassets I., Rose D. W., Glass C. K., Rosenfeld M. G., Fu X. D.* 2008. Nuclear receptor-enhanced transcription requires motor- and LSD1-dependent gene networking in interchromatin granules. *Cell*. 132 : 996—1010.
- Obradovic Z., Peng K., Vucetic S., Radivojac P., Dunker A. K.* 2005. Exploiting heterogeneous sequence properties improves prediction of protein disorder. *Proteins*. 61 : 176—182.
- Oda T., Maeda Y.* 2010. Multiple conformations of F-actin. *Structure*. 18 : 761—767.
- Oosawa W.* 1971. Actin. In: Subunits in biological systems. New York: M. Dekker. 261—322.
- Otterbein L. R., Graceffa P., Dominguez R.* 2001. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science*. 293 : 708—711.
- Paa vilainen V. O., Bertling E., Falck S., Lappalainen P.* 2004. Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol.* 14 : 386—394.
- Pollard T. D., Borisy G. G.* 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112 : 453—465.
- Povarova O. I., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K.* 2007. Different disturbances one pathway of protein unfolding. Actin folding—unfolding and misfolding. *Cell Biol. Int.* 31 : 405—412.
- Straub F. B.* 1942. Actin. In: Studies from the Institute of Medical Chemistry University Szeged. New York: S. Karger Basel. 2 : 3—15.
- Turoverov K. K., Bikashev A. G., Khaitlina S. Y., Kuznetsova I. M.* 1999a. 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 : 105—111.
- Turoverov K. K., Kuznetsova I. M., Khaitlina S. Y., Uversky V. N.* 1999b. Unusual combination of the distorted structure and frozen internal mobility in inactivated actin molecule. *Protein and Peptide Letters*. 6 : 73—78.
- Turoverov K. K., Verkhusha V. V., Shavlovsky M. M., Bikashhev A. G., Povarova O. I., Kuznetsova I. M.* 2002. Kinetics of actin unfolding induced by guanidine hydrochloride. *Biochemistry*. 41 : 1014—1019.
- Uribe R., Jay D.* 2009. A review of actin binding proteins: new perspectives. *Mol. Biol. Rep.* 36 : 121—125.
- Uversky V. N.* 2011. Intrinsically disordered proteins from A to Z. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43 : 1090—1103.
- Uversky V. N., Oldfield C. J., Dunker A. K.* 2005. Showing your ID: intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling. *J. Mol. Recognit.* 18 : 343—384.
- Uversky V. N., Oldfield C. J., Dunker A. K.* 2008. Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept. *Annu. Rev. Biophys.* 37 : 215—246.
- Vartiainen M. K.* 2008. Nuclear actin dynamics — from form to function. *FEBS Lett.* 582 : 2033—2040.
- Vartiainen M. K., Guettler S., Larijani B., Treisman R.* 2007. Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science*. 316 : 1749—1752.
- Verkhusha V. V., Shavlovsky M. M., Nevzglyadova O. V., Gaivoronsky A. A., Artemov A. V., Stepanenko O. V., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K.* 2003. Expression of recombinant GFP-actin fusion on protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res.* 3 : 105—111.
- Visegrady B., Lorinczy D., Hild G., Somogyi B., Nyitrai M.* 2005. A simple model for the cooperative stabilisation of actin filaments by phalloidin and jasplakinolide. *FEBS Lett.* 579 : 6—10.
- 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.
- Winder S. J., Ayscough K. R.* 2005. Actin-binding proteins. *J. Cell Sci.* 118 : 651—654.
- Xue B., Dunbrack R. L., Williams R. W., Dunker A. K., Uversky V. N.* 2010. PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochim. biophys. acta*. 1804 : 996—1010.
- Zheng B., Han M., Bernier M., Wen J.-K.* 2009. Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *FEBS J.* 276 : 2669—2685.

Поступила 20 IV 2015

GLOBULAR ACTIN IS THE PARTIALLY INTRINSICALLY DISORDERED PROTEIN
WITH QUASI-STATIONARY STRUCTURE

O. I. Povarova,^{1,*} Yu. A. Gagarskaia,^{1, 2} V. N. Uversky,^{1, 3, 4} I. M. Kuznetsova,¹ K. K. Turoverov^{1, 2}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064,

² Peter the Great St. Petersburg State Polytechnical University, 194064,

³ Department of Molecular Medicine and USF Health Byrd Alzheimer's Research Institute,
Morsani College of Medicine, University of South Florida, Tampa, FL, USA, 33620-5550,
and ⁴ Institute for Biological Instrumentation, RAS, Pushchino, 142290;

*e-mail: olp@incras.ru

It is shown that the native globular actin (G-actin) is the thermodynamically unstable (quasi-stationary) form of the protein. This state is stabilized by Mg²⁺ (*in vitro* replaced by Ca²⁺). *In vivo* this state occurs as a result of complex energy-consuming post-translational folding processes including chaperone Hsp70, prefoldin and CCT complex, providing the formation of the native structure stabilized by Ca²⁺ and ATP. Structures formed by actin polypeptide chain constantly form complexes with their partners (chaperones Hsp70, prefoldin and chaperonin CCT in folding process, with an Mg ion and ATP in the native state, with numerous actin-binding proteins during the formation and functioning of the cell cytoskeleton, with myosin and other proteins of the muscle contraction in the muscle cells). Actin denaturation is accompanied by self-association of molecules, so the inactivated actin is the thermodynamically stable compact structure consisting of 14—16 protein molecules. Apparently, proteins with quasi-stationary native state are widespread in nature. The emergence of these states is energy-consuming and is conjugated with the inability of the polypeptide chain to form the native compact structure without assistants (complex machinery of protein folding in the cell) and without interaction with their natural partners, in particular with metal ions.

Key words: actin, folding, native structure, aggregation, inactivated actin, quasi-stationary state, intrinsically disordered proteins.