



УДК 577.112:577.322.7

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ИНАКТИВИРОВАННОГО АКТИНА – ПРОМЕЖУТОЧНОЙ ФОРМЫ БЕЛКА В ПРОЦЕССЕ СВОРАЧИВАНИЯ-РАЗВОРАЧИВАНИЯ

© 1998 г. И. М. Кузнецова, С. Ю. Хайтлина, К. К. Туроверов[#]

Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4

Поступила в редакцию 17.11.97 г. Принята к печати 03.03.98 г.

С помощью методов собственной УФ-флуоресценции при стационарном и импульсном возбуждении, избирательного тушения флуоресценции акриламидом, а также тестирования поверхности белка 8-анилинонафталин-1-сульфофосфорной (ANS) исследована структура инактивированного актина из скелетных мышц кролика. Результаты обсуждаются с привлечением ранее полученных данных по седиментации, спектрам КД в ближней и дальней УФ-областях спектра и анизотропии флуоресценции. Термодинамическая стабильность инактивированного актина, наличие вторичной структуры, присущей нативному белку, обратимость перехода инактивированный актин – полностью развернутый актин позволяют рассматривать инактивированный актин в качестве интермедиа на пути сворачивания белка в нативную глобулярную структуру. Инактивация актина *in vitro* сопровождается специфической ассоциацией макромолекул, приводящей к образованию гомогенных (по данным седиментации) и стабильных комплексов. Тенденция к агрегации (или, возможно, как в случае актина, к специфической ассоциации), обусловленная наличием обширных гидрофобных кластеров на поверхности, является, по-видимому, одним из неотъемлемых свойств, присущих любому белку в промежуточном состоянии. Обнаружено, что подвижность боковых цепей остатков аминокислот инактивированного актина существенно отличается от их подвижности в полностью развернутом состоянии. Релаксационные свойства микроокружения триптофановых остатков обеспечивают возникновение достаточно длинноволнового спектра флуоресценции. Однако существующая подвижность недостаточна, чтобы нивелировать асимметрию микроокружения ароматических остатков, о чем свидетельствует наличие выраженного и интенсивного спектра КД в ближней УФ-области. Подвижность индольных колец самих триптофановых остатков, локализованных в инактивированном актине во внутренних, недоступных для растворителя, но полярных областях макромолекулы, даже существенно меньше, чем в нативном актине.

Ключевые слова: актин; промежуточное состояние; расплавленная глобула; триптофан; флуоресценция; тушение флуоресценции; затухание флуоресценции.

В работе Лерера и Кервара [1] впервые установлено, что при нагревании или отщеплении иона Ca^{2+} актин переходит в состояние, которое отличается по свойствам (по положению спектра флуоресценции) от состояния актина в 8 М мочевины. В работе [2] нами показано, что структура с флуоресцентными характеристиками, идентичными тем, которые имеют место для актина, прогретого до 60°C, возникают при частичной денатурации актина в 3–5 М мочевины, при ренатурации из полностью развернутого состояния в 8 М мочевины и спонтанно при хранении растворов актина. Все это позволило рассматривать инактивированный актин как частично денатурированное, термодинамически стабильное промежуточное состояние в процессе сворачивания-разво-

рачивания [2], обнаруженное для многих других белков [3, 4]. По существующим в настоящее время представлениям, промежуточная форма белка по ряду свойств близка к нативному состоянию: она имеет выраженную вторичную структуру и компактность, близкую к компактности глобулярных белков; по другим свойствам она имеет сходство с полностью развернутым состоянием: отсутствует жесткая третичная структура, боковым группам присуща высокая внутримолекулярная подвижность (см., например, [4–8]). По совокупности перечисленных выше свойств частично денатурированное промежуточное состояние белков было названо состоянием расплавленной глобулы [9].

Изучению свойств белков в состоянии расплавленной глобулы уделяется все большее внимание, так как, согласно современным представлениям, оно играет существенную роль не только в процессе биосинтеза [6, 8], но и в ряде других

[#] Автор для переписки (тел.: (812) 247-19-57; факс: (812) 247-03-41; e-mail: KKT@mail.cytspb.rssi.ru).

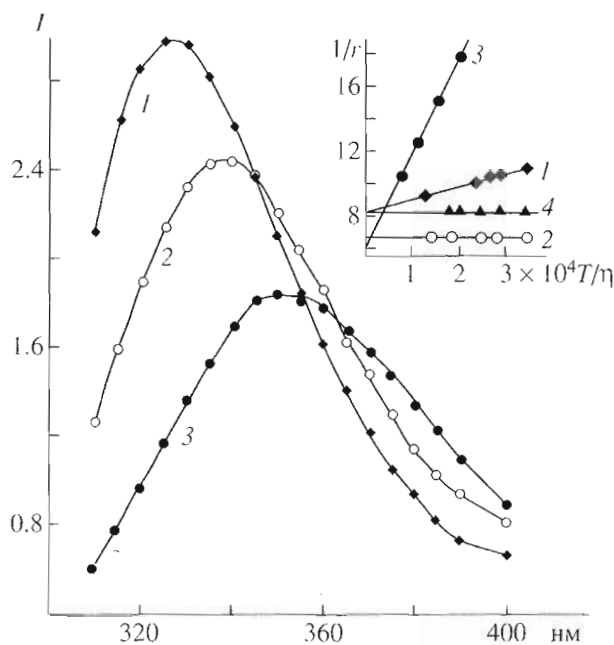


Рис. 1. Спектры флуоресценции и перреновские зависимости (вставка) актина [2] нативного (1), инактивированного (2), актина в 8 М мочевице (3) и F-актина (4).

жизненно важных процессов, происходящих в клетке [5, 10]. Например, считается, что присутствие гидрофобных кластеров на поверхности белков в этом состоянии может облегчать их взаимодействие с шаперонами, мембранами и другими компонентами клетки.

Отличительной особенностью актина, обнаруженной в работе [2], является то, что при переходе в инактивированное состояние значительный длинноволновый сдвиг спектра флуоресценции сопровождается не уменьшением, как можно было бы ожидать, а существенным возрастанием анизотропии флуоресценции (уменьшением величины $1/r$). Неожиданным и до конца не объясненным экспериментальным фактом является также отсутствие для инактивированного актина зависимости величины $1/r$ от вязкости растворителя при изменении состава водно-глицериновой смеси. В связи с этим в настоящей работе предпринято изучение инактивированного актина методами импульсной наносекундной спектродиффузии, избирательного тушения внешним нейтральным тушителем акриламидом и зондирования гидрофобных участков поверхности макромолекулы с помощью 8-анилинонафталин-1-сульфо кислоты (ANS). Результаты обсуждаются с привлечением ранее полученных данных по седиментации, спектрам КД в ближней и дальней

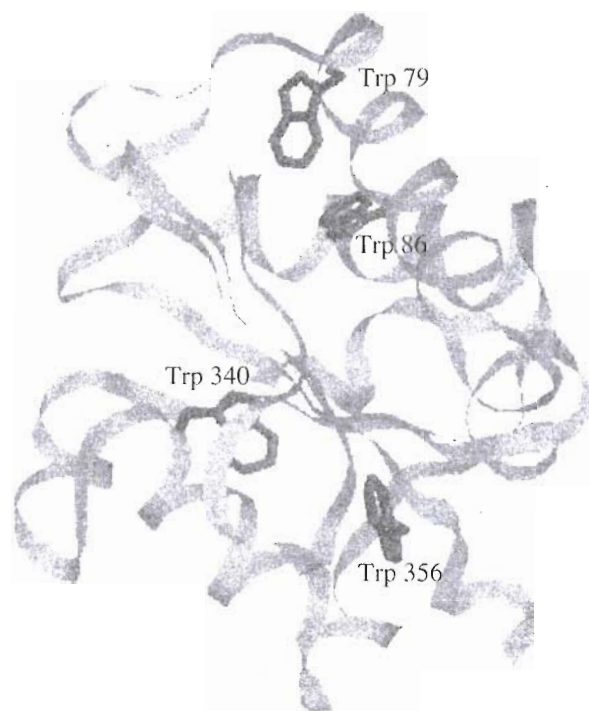


Рис. 2. Локализация триптофановых остатков в субдомене 1 макромолекулы актина. Рисунок выполнен на основании данных о пространственной структуре актина (PDB 1ATN.ent [12, 13]).

УФ-областях спектра и анизотропии флуоресценции при стационарном возбуждении.

Спектры флуоресценции актина в различных структурных состояниях

Актин из скелетных мышц кролика в нативном состоянии (G-актин) имеет относительно коротковолновый спектр флуоресценции ($\lambda_{\text{макс}}$ 325 нм, A 2.6; рис. 1). Анализ микроокружения триптофановых остатков актина [11], выполненный с использованием данных о пространственной структуре белка, содержащейся в Международном банке белковых структур [12, 13], позволил сделать ряд выводов о вкладе отдельных триптофановых остатков в излучение (рис. 2). Показано, что ввиду эффективного безызлучательного переноса энергии по индуктивно-резонансному механизму между остатками Trp⁷⁹ и Trp⁸⁶ и близости к остатку Trp⁸⁶ атома S^γ остатка Cys¹⁰, являющегося эффективным тушителем флуоресценции, эти остатки не вносят значительного вклада во флуоресценцию. Излучение обусловлено в основном двумя другими остатками – Trp³⁴⁰ и Trp³⁵⁶. Микроокружение этих триптофановых остатков имеет высокую плотность упаковки и сформировано в основном неполярными группами белка.

Инактивированный актин по сравнению с интактным актином имеет значительно более длин-

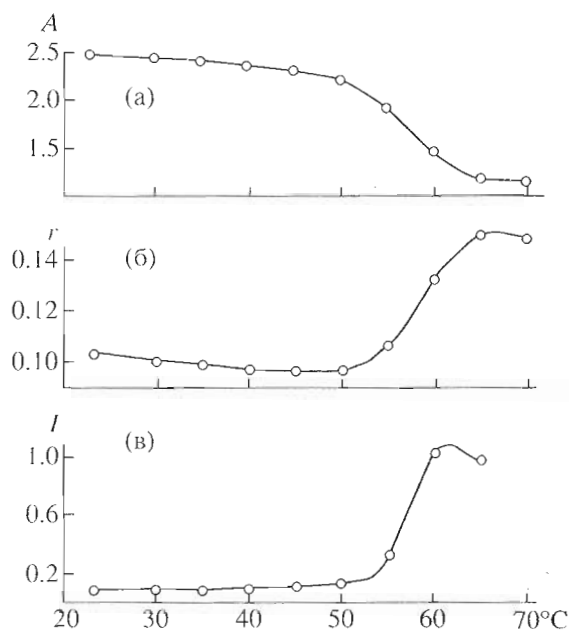


Рис. 3. Изменение при нагревании параметров собственной флуоресценции актина: спектрального параметра A (а) и анизотропии флуоресценции (б), а также интенсивности флуоресценции ANS (в).

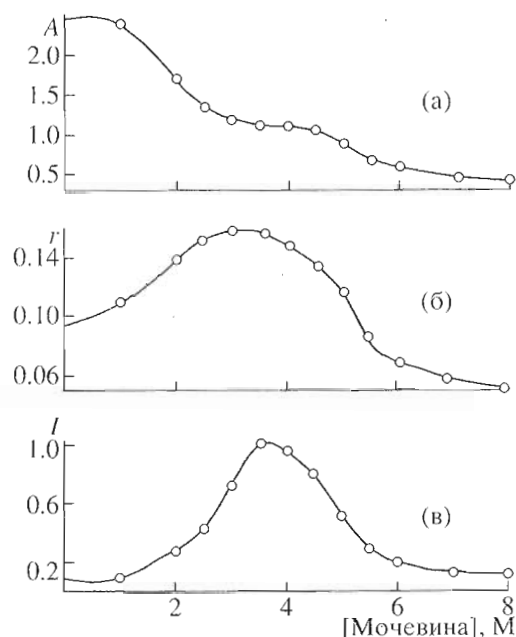


Рис. 4. Зависимость параметров собственной флуоресценции актина и флуоресценции ANS от концентрации мочевины в растворе. Обозначения как на рис. 3.

новолновое положение спектра флуоресценции ($\lambda_{\text{макс}}$ 340 нм; A 1.3; рис. 1). Это свидетельствует о том, что в инактивированном актине ответственные за флуоресценцию триптофановые остатки находятся в полярном и подвижном (релаксирующем за время жизни возбужденного состояния) микроокружении. Спектр флуоресценции инактивированного актина, однако, более коротковолновый по сравнению со спектром флуоресценции белков в полностью развернутом состоянии (в том числе по сравнению со спектром актина в 8 М мочевины: $\lambda_{\text{макс}}$ 350 нм, A 0.4 (рис. 1)). В то же время при переходе в инактивированное состояние не происходит значительного изменения квантового выхода флуоресценции (рис. 1). На основании этого можно предположить, что в инактивированном актине остатки Trp⁷⁹ и Trp⁸⁶, по-видимому, так же как и в случае нативного белка, не вносят существенного вклада в излучение. По-видимому, сохраняется близость этих триптофановых остатков к тушащим группам и высокая эффективность переноса энергии между ними. Такое предположение хорошо согласуется с тем, что в промежуточном состоянии, возможно, в большей степени сохраняется именно структура гидрофильных участков макромолекулы, в то время как гидрофобные группы становятся доступными растворителю и образуют кластеры на поверхности макромолекулы (см. ниже). В таком случае длинноволновый сдвиг спектра флуоресценции и изменение знака спектра КД в ближней УФ-области спектра при инактивации актина [2]

связаны с переходом остатков Trp³⁴⁰ и Trp³⁵⁶ из гидрофобного в полярное окружение.

Очень часто длинноволновый сдвиг спектра флуоресценции белков при различных денатурирующих воздействиях связывают с разрушением глобулярной, плотно упакованной структуры и возникновением более рыхлой, развернутой структуры, в которой ответственные за флуоресценцию триптофановые остатки становятся доступными полярному растворителю. При таком объяснении причин длинноволнового сдвига спектра флуоресценции естественно предположить увеличение подвижности и самого триптофанового остатка, а не только его микроокружения. Однако переход нативный–инактивированный актин сопровождается не уменьшением, как можно было бы ожидать, а увеличением анизотропии флуоресценции (рис. 3 и 4). К тому же анизотропия флуоресценции инактивированного актина не зависит от вязкости смешанного водно-глицеринового растворителя (рис. 1, [2]). Чтобы прояснить эти, на первый взгляд противоречивые результаты спектральных и поляризационных измерений и уточнить представления о локализации и внутримолекулярной подвижности триптофановых остатков инактивированного актина, были измерены времена затухания флуоресценции, выполнено исследование тушения триптофановой флуоресценции внешним нейтральным тушителем – акриламидом.

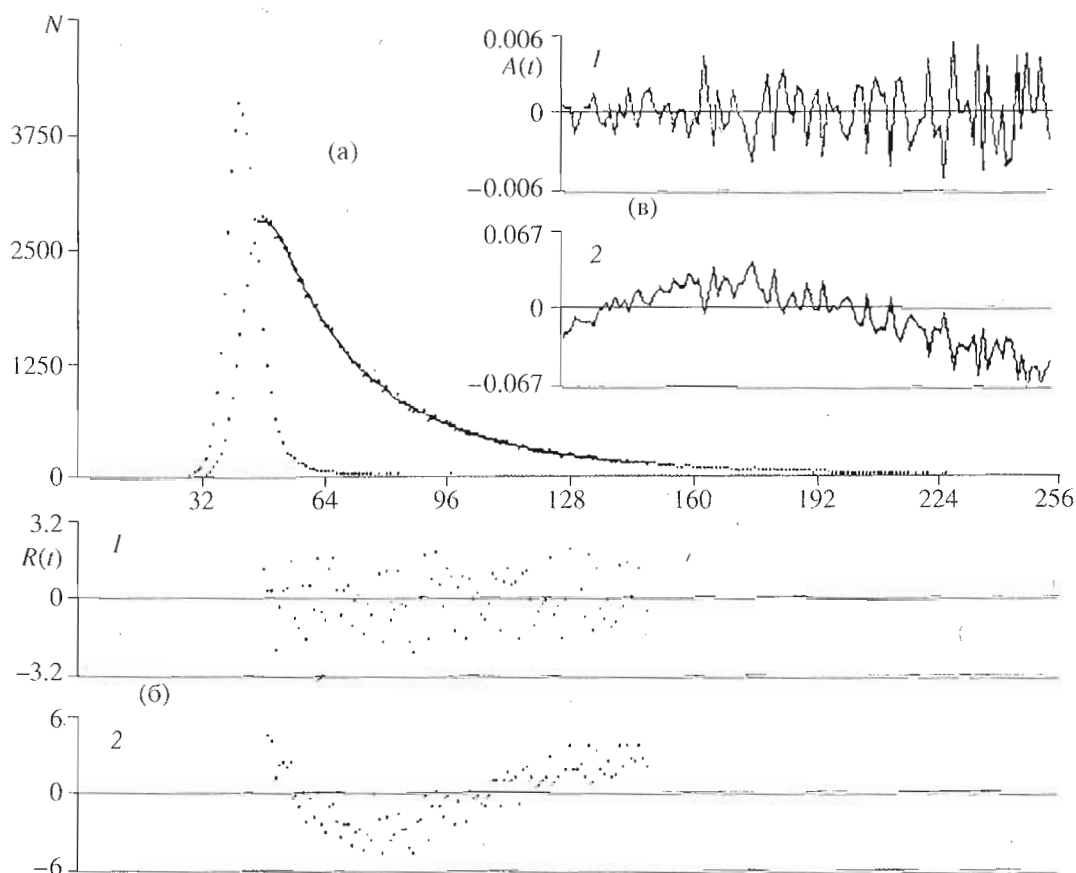


Рис. 5. Затухание флуоресценции инактивированного актина. (а) – Кривая затухания флуоресценции актина (точки – экспериментальные значения, сплошная линия – расчетная кривая в биэкспоненциальном приближении) и профиль импульса лампы; (б) и (в) – распределение остатков и автокорреляционные функции при расчете в моно- (1) и биэкспоненциальном (2) приближении. По оси абсцисс – номер канала (цена канала – 0.159 нс), N – число отсчетов, $R(t)$ – взвешенное отклонение расчетного числа импульсов от экспериментального, $A(t)$ – автокорреляционная функция.

Внутримолекулярная подвижность триптофановых остатков нативного актина

В работе [2] нами установлено, что для G-актина в отличие от инактивированного и F-актина наклон асимптоты кривой зависимости Перрена–Левшина, измеренный путем изменения вязкости смешанного водно-глицеринового растворителя, не равен нулю. В то же время, как и следовало ожидать, наклон асимптоты кривой этой зависимости для G-актина значительно меньше, чем наклон для полностью развернутого белка в 8 М мочевины (рис. 1). Для решения вопроса, обусловлен ли наклон только подвижностью макромолекулы как целого или, кроме того, имеет место внутри-

молекулярная подвижность триптофановых остатков, требуется специальный анализ.

Выполненное в настоящей работе измерение кривых затухания флуоресценции (рис. 5) и определение времен жизни (таблица) позволило оценить время вращательной релаксации ρ (см. “Эксперимент. часть”). Кинетические кривые затухания флуоресценции для нативного, инактивированного и полностью развернутого актина не могут быть удовлетворительно описаны в моноэкспоненциальном приближении, но хорошо описываются биэкспоненциальными кривыми. Поскольку немонотонный характер затухания имеет место и для белков с одним

Времена жизни и константы тушения флуоресценции актина*

Актин	τ_1 , нс	f_1	τ_2 , нс	f_2	$\langle \tau \rangle$, нс	$k_q \times 10^9$, $M^{-1} c^{-1}$	K , M^{-1}	V , M^{-1}
Нативный	6.6	0.48	2.46	0.52	4.4	0.43	1.7	0.68
Инактивированный	7.56	0.49	3.33	0.51	5.4	0.16	0.83	1.18

* Объяснение параметров см. “Эксперимент. часть”.

триптофановым остатком, и для модельных соединений в растворе [14], обнаруженный биэкспоненциальный характер затухания не следует напрямую связывать с существованием в актине нескольких триптофановых остатков. Полученные экспериментально значения τ были использованы для оценки времени вращательной релаксации актина. Величина ρ для G-актина оказалась равной 46 нс.

Чтобы сделать заключение о существовании или отсутствии внутримолекулярной подвижности триптофановых остатков G-актина с временем, сопоставимым с временем жизни возбужденного состояния триптофановых остатков, значение ρ следует сравнить с расчетным значением ρ_0 , которое может быть получено исходя из размеров макромолекулы, ее формы и предполагаемой гидратации (см. [15, 16] и “Эксперимент. часть”). Расчет показал, что для G-актина ρ_0 54 нс. С учетом того, что макромолекула актина может быть вписана в прямоугольный параллелепипед со сторонами 55, 55 и 35 Å [12], т.е. она может быть аппроксимирована сплюснутым эллипсоидом вращения с соотношением осей 1.0 : 1.6, ρ_0 составит, в зависимости от ориентации триптофановых остатков относительно главных осей макромолекулы, от 58 до 62 нс. Сопоставление ρ и ρ_0 свидетельствует о том, что установленный экспериментально наклон асимптоты кривой зависимости Перрена–Левшина нельзя объяснить только подвижностью макромолекулы актина как целого; частично он обусловлен внутримолекулярной подвижностью ответственных за флуоресценцию триптофановых остатков. Расчет показал (см. “Эксперимент. часть”), что характерное время внутримолекулярной подвижности триптофановых остатков, определенное с использованием соотношения (2), составляет приблизительно 180–200 нс. Превышение величины отрезка, отсекаемого зависимостью Перрена–Левшина на оси ординат $1/r'_0$, над величиной $1/r'_0$ (r'_0 – предельная анизотропия триптофановой флуоресценции, отвечающая отсутствию подвижности) свидетельствует об участии триптофановых остатков G-актина также в высокочастотной внутримолекулярной подвижности [16, 17].

Внутримолекулярная подвижность триптофановых остатков инактивированного актина

Переход нативный–инактивированный актин сопровождается возрастанием анизотропии флуоресценции (рис. 3 и 4). Независимость для инактивированного актина величины $1/\tau$ от вязкости растворителя (рис. 1, [21]) означает, что время вращательной релаксации макромолекулы как целого для F-актина и инактивированного актина

много больше времени жизни возбужденного состояния ответственных за флуоресценцию триптофановых остатков. В случае F-актина это связано с включением глобулы актина в полимерную цепь, в случае инактивированного актina – со специфической ассоциацией макромолекул актina при инактивации. По данным седиментационного анализа [2], инактивированный актин представляет собой гомогенные и стабильные ассоциаты с константой седиментации 20S. Строго говоря, независимость величины $1/\tau$ от вязкости растворителя еще не означает, что триптофановые остатки в инактивированном актине не участвуют во внутримолекулярной подвижности наносекундного диапазона. Было показано, что изменение вязкости растворителя может не сказываться на времени внутримолекулярной подвижности триптофановых остатков, если они недоступны растворителю [17]. Поскольку амплитуда высокочастотной внутримолекулярной подвижности триптофановых остатков инактивированного актina меньше соответствующей величины для нативного глобулярного актina и полимерного актina (см. рис. 1; $(1/r'_0)_{\text{иакт}} < (1/r'_0)_G \sim (1/r'_0)_F$), независимость величины $1/\tau$ от вязкости растворителя для инактивированного актina, однако, скорее обусловлена тем, что при инактивации триптофановые остатки в значительной мере или полностью утрачивают внутримолекулярную подвижность наносекундного диапазона.

Тушение флуоресценции акриламидом

Экспериментально измеренные зависимости I_0/I от концентрации акриламида [Q] для нативного и инактивированного актina представляют собой кривые, выгнутые к оси абсцисс (рис. 6). В то же время зависимости τ_0/τ от [Q] во всем экспериментальном интервале изменения концентрации акриламида (до 0.8 М) имеют линейный характер. Это, а также линейный характер зависимости $I_0/I \cdot \exp(V[Q])$ от концентрации акриламида [Q], где V – константа статического тушения, свидетельствуют о существовании как для нативного, так и для инактивированного актina наряду с динамическим статического тушения. Константы Штерн–Фольмера динамического и статического тушения, а также бимолекулярная константа динамического тушения, определенные с учетом измеренных в настоящей работе времен жизни возбужденного состояния (см. предыдущий раздел), представлены в таблице. Полученные результаты свидетельствуют о низкой эффективности динамического тушения флуоресценции актina не только в нативном, но и в инактивированном состоянии.

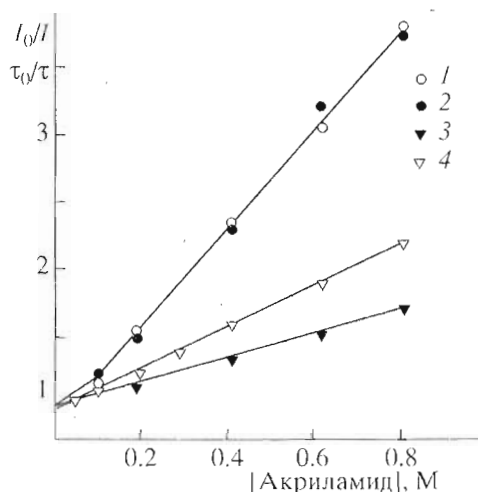


Рис. 6. Тушение флуоресценции нативного (2, 4) и инактивированного (1, 3) актина акриламидом. Данные представлены в координатах Штерна–Фольмера с использованием результатов измерения интенсивности флуоресценции (1, 2) и времени жизни возбужденного состояния (3, 4).

Сродство поверхности макромолекулы инактивированного актина к гидрофобному зонду ANS

Выполненные в настоящей работе эксперименты показали, что тепловая денатурация актина сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции добавленного к раствору ANS на два порядка (рис. 3 и 4). Возрастание интенсивности ANS происходит одновременно с длинноволновым сдвигом спектра и увеличением анизотропии триптофановой флуоресценции. Зависимость интенсивности флуоресценции ANS в растворе актина от концентрации мочевины имеет колоколообразный характер. Интенсивность флуоресценции ANS минимальна в растворе нативного актина и при высоких концентрациях мочевины, переводящих актин в полностью развернутое состояние, достигает максимума при концентрациях мочевины 3.5–4.5 М (рис. 4). В этой же области концентраций мочевины имеет место максимальная величина анизотропии триптофановой флуоресценции. Изменения интенсивности ANS при переходе от инактивированного актина в полностью развернутое состояние, т.е. в области значений концентрации мочевины от 4 до 8 М, полностью обратимы. При переходе к концентрациям мочевины, меньшим 4 М, интенсивность флуоресценции ANS изменяется незначительно, что обусловлено необратимостью перехода нативный–инактивированный актин.

Вне зависимости от концентрации инактивированного актина (в пределах 0.01–0.5 мг/мл) интенсивность ANS достигает насыщения при молярном соотношении белок–ANS = 1 : 14, кото-

рое характеризует число мест связывания ANS на поверхности макромолекулярных комплексов инактивированного актина.

Как известно (см., например, [18]), ANS не связывается как с нативными, растворимыми в воде, белками, так и с клубкообразными полипептидными цепями даже в том случае, если последние имеют в своем составе гидрофобные группы; ANS может связываться с макромолекулой белка только при наличии на ее поверхности обширных гидрофобных кластеров. Высокое сродство к гидрофобному флуоресцентному зонду ANS – одно из наиболее ярких отличительных свойств белков в промежуточном состоянии типа расплавленной глобулы (см., например, [18]). Существование обширных кластеров гидрофобных групп, доступных для растворителя, – заслуживающее особого внимания свойство белков в промежуточном состоянии, в том числе для инактивированного актина.

Структура инактивированного актина

Термодинамическая стабильность инактивированного актина, проявляющаяся в том, что это состояние возникает из нативного состояния при самых разных денатурирующих воздействиях, и, что очень существенно, обратимость перехода инактивированный актин – полностью развернутой актин с восстановлением компактности и вторичной структуры, присущей нативному белку, позволяют рассматривать эту форму актина в качестве интермедиата на пути сворачивания в нативную глобулярную структуру. Обычно такое состояние принято также называть состоянием расплавленной глобулы. Одним из основных свойств белков в промежуточном состоянии типа расплавленной глобулы принято считать высокую подвижность боковых цепей остатков аминокислот, что роднит это состояние с полностью развернутым. Экспериментальные данные по собственной УФ-флуоресценции и КД-спектрам в ближней УФ-области свидетельствуют о том, что инактивированный актин имеет мало сходства с полностью развернутым состоянием, в том числе и по подвижности боковых цепей.

При использовании флуоресцентного метода для оценки релаксационных свойств структуры белка необходимо различать внутримолекулярную подвижность микроокружения триптофановых остатков и внутримолекулярную подвижность достаточно массивных индольных колец самих триптофановых остатков. О подвижности микроокружения триптофановых остатков можно судить по положению спектра флуоресценции в шкале длин волн и по интенсивности спектра КД в ближней УФ-области спектра. Инактивированный актин имеет достаточно длинноволновый спектр флуоресценции ($\lambda_{\text{макс}}$ 340 нм; A 1.3 [2]).

Это свидетельствует о том, что ответственные за флуоресценцию триптофановые остатки находятся в полярном и подвижном, релаксирующем за время жизни возбужденного состояния, микроокружении. В то же время низкая эффективность тушения флуоресценции акриламидом свидетельствует о том, что эти остатки находятся во внутренних, недоступных для растворителя и молекул акриламида областях макромолекулы, а выраженный и интенсивный спектр КД в ближней УФ-области спектра [2] означает, что подвижность боковых цепей аминокислот недостаточна, чтобы нивелировать асимметрию микроокружения триптофановых и тирозиновых остатков.

О подвижности самого триптофанового остатка можно судить только на основании поляризационных измерений. Подвижность триптофановых остатков белков в состоянии расплавленной глобулы изучалась мало. По нашим данным, для актина высокочастотная и наносекундная внутримолекулярная подвижность триптофановых остатков при переходе в промежуточное состояние на пути сворачивания-разворачивания становится даже меньше, чем в нативном состоянии. Данные об уменьшении внутримолекулярной подвижности триптофановых остатков при переходе от нативного актина к инактивированному хорошо укладываются в общую закономерность, установленную нами при сопоставлении спектральных и поляризационных характеристик для достаточно большого числа белков [17]. Оказалось, что высокий уровень внутримолекулярной подвижности имеет место не только для внешних, экспонированных в растворитель триптофановых остатков (что вполне предсказуемо), но и для внутренних, находящихся в гидрофобном окружении. Минимальный уровень внутримолекулярной подвижности установлен для триптофановых остатков, находящихся в микроокружении, образованном полярными группами самого белка (с $\lambda_{\text{макс}}$ флуоресценции 335–345 нм).

Актин отнюдь не единственный объект, для которого переход в промежуточное состояние сопровождается уменьшением подвижности триптофановых остатков. Возрастание анизотропии флуоресценции и увеличение времени вращательной релаксации при переходе из нативного в промежуточное состояние (идентифицированное в цитируемых ниже работах как состояние расплавленной глобулы) зарегистрировано также для α -лактальбумина и карбоангидразы В (экспериментальные данные работ Гельманшина и др. [19] и Родионовой и др. [18]).

Нельзя исключить, что уменьшение подвижности триптофановых остатков при переходе в инактивированное состояние обусловлено ассоциацией макромолекул актина при инактивации. Инактивированный актин представляет собой го-

могенные и стабильные ассоциаты, имеющие константу седиментации 20S [2]. Тенденция к агрегации (или, возможно, как в случае актина, к специфической ассоциации), обусловленная наличием обширных гидрофобных кластеров на поверхности, наряду с сохранением компактности и вторичной структуры, присущей нативному белку, по-видимому, одно из неотъемлемых свойств, присущих любому белку в промежуточном состоянии типа расплавленной глобулы. В этом отношении актин не исключение (см., например, работы [20–23]).

Специфическая ассоциация макромолекул актина при инактивации, очевидно, основная причина, препятствующая обратимости перехода нативный белок–промежуточное состояние. К сожалению, пока не удалось найти условия, при которых инактивация актина не сопровождалась бы ассоциацией макромолекул. Несмотря на то что по сравнению с исследованиями, выполненными ранее [2], концентрация белка была снижена в 50 раз, результаты флуоресцентных спектрально-поляризационных измерений при этом остались неизменными. Пока не привела к положительному результату попытка использования полиэтиленгликоля для предотвращения ассоциации, как это было сделано для карбоангидразы В [20, 24].

В ряде работ необратимость перехода нативный белок–промежуточное состояние не мешала рассматривать промежуточное состояние как интермедиат типа расплавленной глобулы (см., например, [25–27]). Необратимость перехода нативный–инактивированный актин *in vitro* в условиях эксперимента вовсе не означает, что *in vivo* инактивированный актин не может выступать в качестве интермедиата на пути сворачивания белка. Имеются данные, что в клетке существуют условия, при которых высокая гидрофобность поверхности, приводящая *in vitro* к агрегации, может иметь функциональное значение, обеспечивая взаимодействие белка с шаперонами, мембранами и другими компонентами клетки, и что промежуточное состояние макромолекулы белка может быть одной из основных форм “жизни” белка в клетке [10].

Возникает вопрос, всегда ли термин “расплавленная глобула” достаточно хорошо отражает свойства белков в промежуточном состоянии и для всех ли белков подвижность боковых цепей аминокислот (в частности, триптофановых остатков) в промежуточном состоянии на пути сворачивания-разворачивания близка к их подвижности в полностью развернутом состоянии?

На наш взгляд, этот термин не отражает такое свойство белков в промежуточном состоянии на пути сворачивания-разворачивания, как наличие обширных гидрофобных кластеров на поверхно-

сти макромолекулы, и обусловленную этим тенденцию белков в таком состоянии к агрегации или ассоциации. Поэтому, на наш взгляд, свойства актина, а возможно, и других белков в промежуточном состоянии лучше отражает термин "инвертированная глобула".

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Флуоресцентные измерения выполнены с помощью спектрофлуориметрической установки со стационарным возбуждением и импульсной спектрофлуориметрической установки, предназначенной для измерения кинетических кривых флуоресценции [28]. Флуоресценция возбуждалась на длинноволновом краю спектра поглощения излучением ртутной линии 296.7 нм при измерении интенсивности флуоресценции и в той же спектральной области линией азота импульсной газоразрядной лампы при измерении кинетических кривых затухания. При этом, как известно [29], вкладом в излучение тирозиновых остатков можно пренебречь.

О положении спектра флуоресценции в большинстве случаев судили по величине параметра $A = (I_{320}/I_{365})_{297}$, где I_{320} и I_{365} – интенсивность флуоресценции при 320 и 365 нм; 297 нм – длина волны возбуждающего света [30]. В отдельных случаях измеряли полные спектры флуоресценции. Значение параметра A и спектры флуоресценции исправляли на спектральную чувствительность установки. Флуоресценцию ANS возбуждали при 390 нм и регистрировали при 480 нм.

Анализ кривых затухания флуоресценции проводился методом наименьших квадратов с минимизацией по Маркуардту [31] с помощью программы собственной разработки. В качестве эталона использовали раствор *n*-терфенила в этаноле (τ_0 1.02 нс) и *N*-ацетилтриптофанамида в воде (τ_0 3.0 нс). Обработка экспериментальных результатов проводилась в мультиэкспоненциальном приближении:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \exp(-t/\tau_i), \quad (1)$$

где α_i и τ_i – амплитуда и время жизни *i*-го компонента, $\sum \alpha_i = 1$.

Время вращательной релаксации внутримолекулярной подвижности триптофановых остатков ($\rho_{\text{ВМП}}$) определено на основании сопоставления времени вращательной релаксации молекулы как целого (ρ_0) и экспериментально определенно значения ρ [32]:

$$\frac{1}{\rho} = \frac{1}{\rho_0} + \frac{1}{\rho_{\text{ВМП}}}. \quad (2)$$

Величина ρ_0 для сферы, эквивалентной по объему молекуле белка, определялась из соотношения

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

где M – молекулярная масса, \bar{v} – парциальный объем, d – удельная плотность растворителя, ω – коэффициент гидратации, N_A – число Авогадро, k – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура. Минимальные и максимальные значения ρ_0 с учетом эллиптичности молекулы определялись на основании данных работы [33]. Величина ρ была определена с помощью построения зависимостей Перрена–Левшина:

$$\frac{1}{r} = f\left(\frac{T}{\eta}\tau\right), \quad (4)$$

где r – анизотропия флуоресценции, T – абсолютная температура, η – вязкость растворителя, τ – время жизни возбужденного состояния.

При определении ρ учитывали биэкспоненциальный характер затухания флуоресценции. Анизотропия флуоресценции системы центров с одинаковым временем вращательной релаксации ρ и разными временами жизни τ определяется соотношением [32]

$$r = r'_0 \sum \frac{f_i}{1 + \tau_i/\rho} = r'_0 \frac{1}{\sum \alpha_i \tau_i} \sum \frac{\alpha_i \tau_i}{1 + 3\tau_i/\rho}, \quad (5)$$

где α_i – предэкспоненциальные множители при мультиэкспоненциальном законе затухания, f_i – вклад компонента со временем τ_i в суммарное излучение. Для двухкомпонентной системы после несложных преобразований имеем:

$$\frac{r'_0}{r} = 1 + \frac{3/\rho(\alpha_1 \tau_1^2 + \alpha_2 \tau_2^2) + 9/\rho \tau_1 \tau_2 (\alpha_1 \tau_1 + \alpha_2 \tau_2)}{(\alpha_1 \tau_1 + \alpha_2 \tau_2) + 3/\rho \tau_1 \tau_2}. \quad (6)$$

Таким образом, уравнение асимптоты ($\rho \rightarrow \infty$) зависимости $\frac{r'_0}{r} = f(\rho)$ имеет вид

$$\frac{r'_0}{r} = 1 + \frac{3\langle \tau \rangle}{\rho}, \quad (7)$$

где

$$\langle \tau \rangle = \frac{\alpha_1 \tau_1^2 + \alpha_2 \tau_2^2}{\alpha_1 \tau_1 + \alpha_2 \tau_2} = \sum f_i \tau_i. \quad (8)$$

На основании этого при расчете ρ использовано среднеквадратичное значение времени жизни флуоресценции $\langle \tau \rangle$.

Оценка констант тушения флуоресценции сделана на основании уравнения Штерна–Фольмера [34] путем измерения интенсивности флуоресценции

$$I_0/I = 1 + \langle K \rangle [Q] \exp(V[Q]) \quad (9)$$

и времени жизни флуоресценции

$$\bar{\tau}_0/\bar{\tau} = 1 + \langle K \rangle [Q] \quad (10)$$

с учетом биэкспоненциального характера затухания флуоресценции. В соотношениях (9) и (10) I_0 и I – интенсивности, а $\bar{\tau}_0$ и $\bar{\tau}$ – средневзвешенные ($\bar{\tau} = \sum \alpha_i \tau_i$) времена жизни флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя в концентрации $[Q]$, V – константа статического тушения, $\langle K \rangle$ – константа динамического тушения. В случае биэкспоненциального затухания: $\langle K \rangle = k_q \langle \tau_0 \rangle$. Здесь k_q – бимолекулярная константа процесса столкновения флуоресцирующих молекул в возбужденном состоянии и молекул тушителя, а $\langle \tau_0 \rangle$ – среднеквадратичное время жизни флуоресценции в отсутствие тушителя.

G-актин, экстрагированный из скелетных мышц кролика, был приготовлен с помощью метода, описанного ранее [35]. Препараты очищались от примесей других белков и инактивированного актина путем проведения одного или двух циклов полимеризации-деполимеризации с использованием для полимеризации 30 мМ КСl. Контроль за нативностью препаратов актина осуществлялся путем регистрации параметра A . Использовались препараты актина, у которых значение параметра A составляло не менее 2.56, что соответствует содержанию инактивированного актина не более 2% [30].

Инактивированный актин получен путем нагревания раствора G-актина до 60°C и инкубации при этой температуре в течение 30 мин или путем перевода актина в 8 М мочевины и последующего диализа против раствора Риса–Янга. Использовались препараты инактивированного актина, имеющие параметр A 1.30 ± 0.05 .

Концентрацию белка измеряли спектрофлуориметрически с помощью спектрофотометра Cecil 2000 (Англия) с использованием коэффициента молярной экстинкции $E_{280}^{1\text{cm}} = 1.09$ [36]. Концентрация растворов актина варьировала в экспериментах от 0.01 до 0.5 мг/мл. Изменения концентрации белка в этих пределах не оказывали заметного влияния на результаты экспериментов.

Препараты акриламида (Wako pure chemical industries LTD, Япония), *n*-терфенила (Sigma, США), 8-анилинонафталин-1-сульфокислоты (ANS) и *N*-ацетилтриптофанамида (Serva, Германия) использовались в работе без дополнительной очистки.

Авторы выражают благодарность В.Н. Уверскому за ценные замечания и заинтересованное обсуждение работы.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 96-04-49666 и № 96-04-49659) и INTAS (грант № 94-1289) с использованием технических средств СПб объединенного исследовательского центра (ЦКП).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lehrer S.L., Kerwar G. // *Biochemistry*. 1972. V. 11. P. 1211–1217.
2. Kuznetsova I.M., Khaitlina S.Yu., Konditerov S.N., Surin A.M., Turoverov K.K. // *Biophys. Chemistry*. 1988. V. 32. P. 73–78.
3. Dolgikh D.A., Gilmanshin R.I., Brazhnikov E.V., Bychkova V.E., Semisotnov G.V., Venyaminov S.Yu., Ptitsyn O.B. // *FEBS Lett.* 1981. V. 136. P. 311–315.
4. Бычкова В.Е., Птицын О.Б. // *Биофизика*. 1993. Т. 38. С. 58–66.
5. Bychkova V.E., Ptitsyn O.B. // *Chemtracts – Biochemistry and Molecular Biology*. 1993. V. 4. P. 133–163.
6. Kuwajima K. // *Proteins: Struct. Func. Gene*. 1989. V. 6. P. 87–103.
7. Christensen H., Pain R.H. // *Eur. Biophys. J.* 1991. V. 19. P. 221–229.
8. Ptitsyn O.B. // *Adv. Protein. Chem.* 1995. V. 47. P. 83–229.
9. Ohgushi M., Wada A. // *FEBS Lett.* 1983. V. 164. P. 21–24.
10. Бычкова В.Е., Птицын О.Б. // *Цитология*. 1995. Т. 37. С. 1238–1249.
11. Туроверов К.К., Кузнецова И.М. // *Биоорган. химия*. 1998. Т. 24. С. 893–898.
12. Kabsch W., Mannherz H.G., Suck D., Pai E.F., Holmes H.C. // *Nature*. 1990. V. 347. P. 37–44.
13. Bernstein F.C., Koetzle T.F., Williams G.J.B., Meyer Jr. E.F., Brice M.D., Rodgers J.R., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M. // *J. Mol. Biol.* 1977. V. 112. P. 535–542.
14. Szabo A.G., Rayner D.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 1980. V. 102. P. 554–563.
15. Кузнецова И.М., Кирик И.И., Туроверов К.К. // *Молекулярн. биология*. 1981. Т. 15. С. 989–999.
16. Туроверов К.К., Кузнецова И.М. // *Молекулярн. биология*. 1983. Т. 17. С. 468–474.
17. Кузнецова И.М., Туроверов К.К. // *Молекулярн. биология*. 1983. Т. 17. С. 741–754.
18. Родионова Н.А., Семисотнов Г.В., Кутьиенко В.П., Уверский В.Н., Болотина И.А., Бычкова В.Е., Птицын О.Б. // *Молекулярн. биология*. 1989. Т. 23. С. 683–692.
19. Гильманишин Р.И., Долгих Д.А., Птицын О.Б., Финкельштейн А.В., Шахнович Е.И. // *Биофизика*. 1982. Т. 27. С. 1005–1015.
20. Cleland J.L., Randolph T.W. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 3147–3153.

21. Gokhale R.S., Agarwalla S., Santi D.V., Balaram P. // *Biochemistry*. 1996. V. 35. P. 7150–7158.
22. Gezimati J., Singh H., Creamer L.K. // *J. Agric. Food Chem.* 1996. V. 44. P. 804–810.
23. Tani F., Murata M., Higasa T., Goto M., Kitabatake N., Doi E. // *J. Agric. Food Chem.* 1995. V. 43. P. 2325–2331.
24. Cleland J.L., Hedgpeeth C., Wang D.J.C. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 13327–13334.
25. Uversky V.N., Narizhneva N.V., Ivanova T.V., Kirkitadze M.D., Tomashevski A.Y. // *FEBS Lett.* 1997. V. 410. P. 280–284.
26. Lascu I., Schaertl S., Wang C., Sarger C., Giartosio A., Briand G., Lacombe M.L., Konrad M.L. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 15599–15602.
27. Bam N.B., Cleland J.L., Randolph T.W. // *Biotechnol. Prog.* 1996. V. 12. P. 801–809.
28. Кузнецова И.М., Туроверов К.К. // *Цитология*. 1998. Т. 40 (в печати).
29. Бурштейн Э.А. Люминесценция белковых хромофоров (модельные исследования). *Итоги науки и техники. Сер. Биофизика*. Т. 6. М.: ВИНТИ, 1976. 213 с.
30. Turoverov K.K., Khaitlina S.Yu., Pinaev G.P. // *FEBS Lett.* 1976. V. 62. P. 4–7.
31. Zuker M., Szabo A.G., Bramall L., Krajcarski D.T., Selinger B. // *Rev. Sci. Instrum.* 1985. V. 56. P. 14–22.
32. Ануфриева Е.В., Готлиб Ю.Я., Краковяк М.Г., Скороходов С.С. // *Высокомолекул. соединения*. 1972. Т. 14А. С. 1430–1450.
33. Small E.W., Isenberg I. // *Biopolymers*. 1977. V. 16. P. 1907–1928.
34. Eftink M., Ghiron C.A. // *Anal. Biochem.* 1981. V. 114. P. 199–227.
35. Khaitlina S.Yu., Collins J.H., Kuznetsova I.M., Pershina V.P., Sinakevich I.G., Turoverov K.K., Usmanova A.M. // *FEBS Lett.* 1991. V. 279. P. 49–51.
36. Rees M.K., Young M. // *J. Biol. Chem.* 1967. V. 242. P. 4449–4458.

Structural Properties of Inactivated Actin, an Intermediate Form in the Folding–Unfolding of Actin

I. M. Kuznetsova, S. Yu. Khaitlina, and K. K. Turoverov[#]

Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretskii pr. 4, St. Petersburg, 194064 Russia

The structure of inactivated actin was studied by the methods of intrinsic fluorescence upon stationary and pulse excitation, selective fluorescence quenching with acrylamide, and testing the protein surface with a hydrophobic probe, 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS). The results are discussed along with earlier data on actin sedimentation, near- and far-UV CD spectra, and fluorescence anisotropy. The thermodynamic stability of inactivated actin, the presence of a secondary structure characteristic of the native protein, and the reversibility of the inactivated actin–completely unfolded actin transition allow inactivated actin to be considered an intermediate form in the process of protein folding into the native globular structure. *In vitro* actin inactivation is accompanied by specific association of actin macromolecules resulting in the formation of homogeneous stable complexes. The tendency toward aggregation (or specific association, in the case of actin), which is determined by the presence of extended hydrophobic clusters on the molecule surface, appears to be one of the intrinsic properties of any protein in the intermediate state. The mobility of the amino acid side chains in the inactivated actin differs considerably from that in the completely unfolded actin. The relaxation properties of the microenvironment of tryptophan residues determine relatively long-wave fluorescence spectra of the inactivated actin. However, the mobility observed is insufficient to compensate the asymmetry of the microenvironment of aromatic residues, which is confirmed by a characteristic and intense CD spectrum in the near-UV region. The mobility of the indole rings of tryptophans located in the internal regions of the inactivated actin that are solvent-inaccessible although polar is even considerably lower than that in the native actin.

Key words: actin, intermediate state, molten globule, tryptophan, fluorescence, fluorescence quenching, fluorescence decay

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (812) 247-1957; fax: +7 (812) 247-0341; e-mail: KKT@mail.cytspb.rssi.ru.