

УДК 577.112:577.322.7

О.И.Поварова (6 курс, каф. БФ),
К.К.Туроверов, д.ф.-м.н., зам. дир. (ИНЦ РАН)

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ СВРАЧИВАНИЯ - РАЗВОРАЧИВАНИЯ АКТИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИДРОФОБНОГО ЗОНДА АНС

Регистрация флуоресценции гидрофобного зонда 1-анилинонафталин-8-сульфоната (АНС) является мощным инструментом обнаружения и исследования промежуточных частично-свернутых денатурированных состояний типа расплавленной глобулы, а также аморфных агрегатов частично-свернутых форм белков (см. например [1]). Это обусловлено тем, что квантовый выход этого красителя возрастает в сотни раз при его взаимодействии с кластерами гидрофобных аминокислот белка, в то время как свободный АНС практически не флуоресцирует в водном растворе. Лишь некоторые белки могут связывать АНС в нативном состоянии. В качестве примера можно привести сывороточный альбумин. Большинство белков в нативном состоянии не имеют гидрофобных участков, способных связывать АНС. Не способны связывать АНС также и белки в полностью развернутом состоянии.

Регистрация зависимости интенсивности АНС в растворах актина с различным содержанием гуанидингидрохлорида (GdmCl), измеренная после 24 часов инкубации в растворах денатуранта соответствующей концентрации показала, что АНС обладает высокой интенсивностью флуоресценции в растворах актина с содержанием GdmCl от 0.8 до 1.8 М. Это позволило заключить, что АНС не связывается с актином в нативном и полностью развернутом состояниях и эффективно взаимодействует с инактивированным актином [2]. Изучение кинетики процессов сворачивания-разворачивания позволило сделать заключение о том, что переход актина из нативного состояния в инактивированное под действием GdmCl проходит через стадию существенного разворачивания макромолекулы белка [3]. Использование параметрического представления результатов кинетических экспериментов (построение зависимости между $I_{320}(t)$ и $I_{365}(t)$, где в качестве параметра выступает интервал времени t после смешения растворов белка и гуанидингидрохлорида соответствующей концентрации) позволило сделать заключение, что существенно развернутый кинетический интермедиат, предшествующий образованию инактивированного актина, имеет более коротковолновый по сравнению с полностью развернутым состоянием спектр флуоресценции [4].

Задача настоящей работы состояла в том, чтобы:

- более полно охарактеризовать комплексообразование АНС с инактивированным актином и, в частности, определить константу связывания и число мест связывания АНС с актином в этом состоянии;
- выполнить изучение кинетики разворачивания актина с использованием в качестве регистрируемой характеристики флуоресценции АНС;
- на основании анализа полученных кинетических кривых решить вопрос о том, способен ли обнаруженный существенно развернутый кинетический интермедиат, предшествующий образованию инактивированного актина, связывать АНС.

В экспериментах был использован инактивированный актин, полученный путем инкубации растворов нативного актина при 60⁰С в течение часа. Величина параметра $A = I_{320} / I_{365}$, использовавшегося в экспериментах инактивированного актина составляла 1.30 ± 0.02 .

Проведено измерение зависимости интенсивности флуоресценции АНС в растворах инактивированного актина от концентрации АНС при фиксированной концентрации белка и от концентрации белка при фиксированной концентрации красителя. Оптическая плотность растворов при длине волны возбуждающего света (365 нм) не превышала 0.15. Это позволяет считать, что интенсивность флуоресценции во всех случаях была пропорциональна концентрации красителя, образовавшего комплекс с белком. Несмотря на то, что отношение

содержания АНС: белок в экспериментах варьировало в очень широких пределах (от 1 до 300), зависимость интенсивности флуоресценции АНС от концентрации АНС и белка оставалась практически линейной. Это, по-видимому, обусловлено низкой константой связывания и большим числом посадочных мест для АНС на инактивированном актине.

Были также измерены кинетические зависимости интенсивности флуоресценции АНС при различных концентрациях GdmCl. Оказалось, что скорость возрастания интенсивности флуоресценции зависит от концентрации GdmCl и изменяется во времени. При увеличении концентрации GdmCl от 0.1 до 0.7 М интенсивность флуоресценции красителя монотонно увеличивается в течение первых 10 мин. При концентрациях GdmCl 0.7 – 1.0 М за первые 10 мин интенсивность флуоресценции достигает величины существенно большей той, которая характерна для инактивированного актина для данной концентрации GdmCl в стационарных условиях (через 24 часа). Сделано предположение, что наблюдаемые зависимости отражают образование инактивированного актина (монодисперсного ассоциата, состоящего из 15 макромолекул), через стадию возникновения мономерной формы инактивированного актина, более эффективно связывающего АНС по сравнению с ассоциатом.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Родионова Н.А. (1990) Изучение компактизации глобулярных белков. Дисс. канд. физ.-мат. наук, МФТИ.
2. Kuznetsova, I.M., Biktashev, A.G., Khaitlina, S.Yu., Vasilenko, K.S., Turoverov, K.K., and Uversky, V.N. (1999) *Biophys.J.* 77, 2788-2800.
3. Turoverov K.K., Verkhusha V.V., Shavlovsky M.M., Biktashev A.G., Povarova O.I. and Kuznetsova I.M. (2002) *Biochemistry* 41, 1014-1019.
4. Kuznetsova, I.M., Stepanenko, Olga V., Stepanenko, Olesia V., Povarova O.I., Biktashev A.G., Verkhusha V.V., Shavlovsky M.M., and Turoverov, K.K. (2002) *Biochemistry* 41, 13127 -13132.