

УДК 577.112:577.322.7

Олеся В. Степаненко (6 курс, каф. БФ),
К.К. Туроверов, д.ф.-м.н., зам. дир. (ИНЦ РАН)

КИНЕТИКА ОБРАЗОВАНИЯ И СВОЙСТВА ПРОМЕЖУТОЧНЫХ СОСТОЯНИЙ АКТИНА, ВОЗНИКАЮЩИХ В ПРОЦЕССЕ СВОРАЧИВАНИЯ-РАЗВОРАЧИВАНИЯ БЕЛКА

Актуальность изучения структуры и путей образования частично-свернутых, агрегированных состояний белков обусловлена ее значимостью для решения фундаментальной проблемы самосборки белков в процессе биосинтеза. Эти исследования имеют также практическое значение для медицины (в виду существования так называемых конформационных болезней, связанных с нарушением фолдинга белков) и биотехнологии (в связи с возникновением неправильно свернутых ассоциатов рекомбинантных белков и их накоплением в телах включения).

Целью данной работы явилось изучение свойств обнаруженного нами кинетического интермедиата - предшественника инактивированного актина и выяснение роли инактивированного актина и его предшественника в процессах сворачивания-разворачивания [1-3].

Актин получали из скелетных мышц кролика. Контроль за нативностью препаратов актина осуществляли путем регистрации параметра A ($A=I_{320}/I_{365}$, где I_{320} и I_{365} – интенсивности флуоресценции, измеренные при длине волны 320 и 365 нм соответственно). Использовали препараты актина, у которых значение параметра A составляло не менее 2.53, что соответствует содержанию инактивированного актина не более 4%.

Флуоресцентные измерения были выполнены с использованием спектрофлуориметрической установки со стационарным возбуждением [4]. Флуоресценция возбуждалась на длинноволновом краю спектра поглощения, где вклад тирозиновых остатков незначителен. Кинетические эксперименты были выполнены с использованием ручного смешивания, при этом, как показывают контрольные эксперименты, мертвое время составляет менее 4 секунд.

Параметрическое представление кинетических зависимостей интенсивности флуоресценции при денатурации нативного актина, измеренных при двух длинах волн, позволило выявить и охарактеризовать новый существенно развернутый кинетический интермедиат [5]. Показано, что по своим свойствам это состояние отличается от полностью развернутого состояния актина. В частности, в этом состоянии актин имеет более коротковолновый спектр флуоресценции. Установлено, что переход из инактивированного в полностью развернутое состояние также является двухстадийным процессом и осуществляется через стадию образования существенно развернутого кинетического интермедиата.

Предложена новая схема процессов сворачивания-разворачивания актина, согласно которой: 1) появление существенно развернутого кинетического интермедиата (U^*) предшествует образованию полностью развернутого состояния (U) или инактивированного актина (I); 2) существенно развернутый кинетический интермедиат U^* возникает на пути сворачивания-разворачивания белковой макромолекулы (on line intermediate); 3) инактивированный актин является результатом неправильного сворачивания белка (off line intermediate) и данное состояние стабилизируется агрегацией частично-свернутых макромолекул белка.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Turoverov, K.K., Verkhusha V.V., Shavlovsky M.M., Biktashev A.G., Povarova, O.I., and Kuznetsova, I.M. (2002) *Biochemistry* 41, 1014-1019.

2. Kuznetsova, I.M., Biktashev, A.G., Khaitlina, S.Yu., Vassilenko, K.S., Turoverov, K.K., and Uversky, V.N. (1999) *Biophys.J.* 77, 2788-2800.
3. Turoverov, K.K., Biktashev, A.G., Khaitlina, S.Yu., and Kuznetsova, I.M. (1999) *Biochemistry* 38, 6261-6269.
4. Тuroверов К.К., Бикташев А.Г., Дорофеюк А.С., Кузнецова И.М. (1998) *Цитология*, 40, 806-817.
5. Kuznetsova, I.M., Stepanenko, Ol'ga V., Stepanenko, Olesia V., Povarova O.I., Biktashev A.G., Verkhusha V.V., Shavlovsky M.M., and Turoverov, K.K. (2002) *Biochemistry*, In Press.