

На правах рукописи

СТЕПАНЕНКО
Ольга Викторовна

ФОЛДИНГ ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ПЕРИПЛАЗМЫ
БАКТЕРИЙ. РОЛЬ ЛИГАНДОВ В СТАБИЛИЗАЦИИ ИХ СТРУКТУРЫ

03.00.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2008

Работа выполнена в Институте цитологии РАН

Научные руководители: доктор физико-математических наук, проф.
Константин Константинович ТУРОВЕРОВ,
Институт цитологии РАН

доктор биологических наук
Ирина Михайловна КУЗНЕЦОВА,
Институт цитологии РАН

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, проф.
Владимир Иосифович ВОРОБЬЕВ,
Институт цитологии РАН

доктор биологических наук, проф.
Дмитрий Иванович ЛЕВИЦКИЙ,
Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Ведущая организация: Петербургский институт ядерной физики
им. Б.П. Константинова РАН

Защита состоится "20" июня 2008 года в 13 ч. на заседании Диссертационного совета Д.002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.

e-mail: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru

сайт: www.cytspb.rssi.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН.

Автореферат разослан "19" мая 2008 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Е. В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Процессы разворачивания–сворачивания белков, их устойчивости к действию химических денатурантов и нагреванию, структура и механизмы образования частично-свернутых форм белков являются в настоящее время предметом интенсивных исследований, проводимых многими научными коллективами мира. Актуальность этих исследований обусловлена как их значимостью для решения фундаментальной проблемы фолдинга белков, так и тем обстоятельством, что ассоциация макромолекул белков в денатурированных частично-свернутых состояниях представляет существенную проблему для медицины [1-6] и биотехнологии [3, 7-8]. Специфическая ассоциация, приводящая к образованию амилоидных фибрилл, сопутствует ряду тяжелых заболеваний (так называемых “конформационных болезней”), таких как нейродегенеративные болезни Альцгеймера и Паркинсона, злокачественная миелома, прионные заболевания, а образование аморфных агрегатов при синтезе рекомбинантных белков, приводящее к возникновению белковых преципитатов, является наиболее существенным препятствием при получении нативных рекомбинантных белков.

К настоящему времени хорошо охарактеризованы процессы фолдинга–рефолдинга небольших мономерных белков. Фолдинг мультидоменных и олигомерных белков, а также белков, содержащих в своем составе лиганды, изучен в значительно меньшей степени. В связи с этим значительный интерес представляет исследование фолдинга белков, принадлежащих к большому классу периплазматических лиганд-связывающих белков, участвующих в процессах активного транспорта различных биологически-активных веществ (углеводов, аминокислот, анионов, ионов металлов, дипептидов и олигопептидов), процессах хемотаксиса и кооперативной чувствительности (quorum sensing) бактерий. В настоящей работе объектами исследования стали глутамин-связывающий белок и D-галактоза/D-глюкоза-связывающий белок из *Escherichia coli*. Связывание этих белков с их лигандами (глутамином и сахарами) приводит к большим структурным изменениям третичной структуры белка, что делает возможным использование этих белков при конструировании социально значимых биосенсоров для определения содержания глутамина и сахаров. Последнее имеет важное практическое значение для биотехнологии (определение уровня глутамина в клеточных культурах; [9]) и медицинской биохимии (неинвазивное определение уровня сахара в крови диабетических больных; [10]). Поскольку при использовании лиганд-связывающих белков в качестве чувствительного элемента биосенсоров важно использовать такие формы белков, которые отличаются высоким уровнем устойчивости к агрессивному действию окружающей среды, немаловажным является изучение стабильности этих белков.

Цель и задачи исследования. Цель работы состояла в изучении процессов сворачива-

ния–разворачивания глутамин-связывающего белка и D-галактоза/D-глюкоза-связывающего белка. В задачи работы входило:

1. Изучение процессов денатурации глутамин-связывающего белка и D-галактоза/D-глюкоза-связывающего белка под действием гуанидингидрохлорида (GdnHCl);
2. Определение количества промежуточных состояний, возникающих в процессе денатурации глутамин-связывающего белка и D-галактоза/D-глюкоза-связывающего белка и изучение свойств этих промежуточных состояний;
3. Выяснение, является ли денатурация глутамин-связывающего белка и D-галактоза/D-глюкоза-связывающего белка под действием GdnHCl обратимой;
4. Исследование роли лигандов – глутамина, в случае глутамин-связывающего белка, и D-глюкозы и иона кальция, в случае D-галактоза/D-глюкоза-связывающего белка – в стабилизации структуры этих белков к денатурирующему действию GdnHCl и нагревания.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Связывание лиганда стабилизирует структуру лиганд-связывающих белков и делает процесс их разворачивания более кооперативным, однако не влияет на путь разворачивания белка и число возникающих при этом промежуточных состояний.
2. Несмотря на сходство структуры глутамин-связывающего белка и D-галактоза/D-глюкоза-связывающего белка, характер процессов разворачивания этих белков существенно различается: разворачивание D-галактоза/D-глюкоза-связывающего белка осуществляется по принципу “все или ничего”, при разворачивании глутамин-связывающего белка образуется два промежуточных частично-свернутых состояния. Одно из этих состояний является состоянием типа расплавленной глобулы, его возникновение сопровождается ассоциацией молекул глутамин-связывающего белка.
3. Хотя связывание лиганда вызывает существенные преобразования структуры лиганд-связывающих белков, их флуоресцентные характеристики изменяются при этом незначительно.

Научная новизна исследований. Результаты исследования процессов разворачивания–сворачивания глутамин-связывающего белка и D-галактоза/D-глюкоза-связывающего белка, получены впервые. Впервые установлено трехстадийное, но обратимое разворачивание глутамин-связывающего белка и одностадийное, обратимое разворачивание D-галактоза/D-глюкоза-связывающего белка под действием GdnHCl. Показано, что лиганд не только делает структуру белка более устойчивой по отношению к денатурирующему действию GdnHCl и нагреванию, но и делает процесс денатурации более кооперативным. Впервые охарактеризована стабильность белков путем определения величин свободных энергий Гиббса.

Впервые установлено, что, несмотря на значительные структурные преобразования, происходящие в глутамин-связывающем белке и D-галактоза/D-глюкоза-связывающем белке при связывании соответствующих лигандов, характеристики их триптофановой флуоресценции при этом изменяются незначительно. Сделано заключение о том, что собственная флуоресценция D-галактоза/D-глюкоза-связывающего белка вряд ли может использоваться в качестве регистрируемой характеристики при создании биосенсоров для неинвазивного определения содержания сахара в крови больных диабетом. Тем не менее, существенные изменения пространственной структуры белков при связывании лигандов открывают возможности для использования при конструировании биосенсоров явления поверхностного плазмонного резонанса, а также эффекта переноса энергии при введении в белок флуоресцентных меток – донора и акцептора энергии возбуждения.

На примере глутамин-связывающего белка впервые показано, что вклад отдельных триптофановых остатков в суммарную флуоресценцию белка может зависеть от длины волны возбуждающего света. Предложен метод учета этого эффекта.

Теоретическое и практическое значение работы. Новые данные о процессах сворачивания–разворачивания глутамин-связывающего белка и D-галактоза/D-глюкоза-связывающего белка, а также роли лигандов в этом процессе, существенны для более глубокого понимания роли лигандов в процессах фолдинга этих белков и устойчивости их структуры к действию различных химических денатурантов и нагреванию. Эти данные существенны также для понимания процессов фолдинга сложных мультидоменных белков.

Данные о характере процессов сворачивания–разворачивания глутамин-связывающего белка и D-галактоза/D-глюкоза-связывающего белка могут иметь важное практическое значение при их использовании в качестве чувствительных элементов биосенсорных систем на глутамин и сахара.

Существенной методической разработкой является установление того факта, что вклад отдельных триптофановых остатков в суммарную флуоресценцию белка может зависеть от длины волны возбуждающего света. Этот эффект необходимо учитывать при использовании метода собственной УФ-флуоресценции для изучения структуры и конформационных изменений белков, при оценке вклада тирозиновых остатков в суммарную флуоресценцию белка, а также при разложении спектра флуоресценции белков, содержащих несколько триптофановых остатков, на составляющие.

Результаты работы используются при проведении лекционно-практических занятий для студентов 4 курса Кафедры биофизики СПбГПУ.

Апробация работы. Основные положения работы были представлены на 8-й международной Пущинской школе-конференции молодых ученых (Пущино, 2004), III Съезде биофи-

зиков России (Воронеж, 2004), итальянской конференции по биохимии (Италия, Витербо, 2004), XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов-2007” (Москва, 2007), 12-й Европейской конференции по спектроскопии биологических молекул (Бобиньи, Франция, 2007) и 4-й Санкт-Петербургской конференции молодых ученых “Современные проблемы науки о полимерах” (Санкт-Петербург, 2008).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 статьи в отечественных и зарубежных рецензируемых журналах, 2 статьи в сборниках, а также тезисы 7 докладов на всероссийских и международных конференциях и съездах.

Финансовая поддержка работы. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48231), INTAS (грант 01-2347), Программы РАН “Молекулярная и клеточная биология”, Программы “Ведущие научные школы РФ” (НШ-9396.2006.4; НШ-1961.2008.4), администрации Санкт-Петербурга (грант 02/2.6/15-03/39) и Фонда содействия отечественной науке по программе “Лучшие аспиранты РАН”. Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП “Материаловедение и диагностика в передовых технологиях”.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, трех глав, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 132 страницах, содержит 11 таблиц и 30 рисунков. Библиография включает 179 наименований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. Препараты глутамин-связывающего белка (GlnBP) из *Escherichia coli* и D-галактоза/D-глюкоза-связывающего белка (GGBP) из *Escherichia coli* предоставлены проф. Д'Ауриа (Институт биохимии белка, Неаполь, Италия). Белки GlnBP и GGBP из *Escherichia coli* были получены и очищены согласно известным методикам [9, 11]. Эксперименты выполнены при концентрации растворов белков 0.1 – 0.3 мг/мл. Для образования комплекса белок – лиганд в раствор белка добавляли Glc и Gln в концентрации 10^{-3} – 10^{-2} М.

Препараты D-глюкозы и L-глутамин (Sigma, США), гуанидингидрохлорида (GdnHCl) (Nacalai Tesque, Япония) и 1-анилинонафталин-8-сульфоната (АНС) (Serva, США) использовали без дополнительной очистки. При отщеплении иона кальция использовали раствор 1 мМ ЭДТА фирмы Fluka (Швейцария). Во всех экспериментах с GGBP использовали 10 мМ TrisHCl буфер (pH 7.4), при работе с GlnBP – 10 мМ TrisHCl буфер (pH 8.5).

Анализ пространственной структуры белка. Свойства микроокружения и локализацию триптофановых и тирозиновых остатков в GGBP и GlnBP и в их комплексах с лигандами анализировали с использованием данных о пространственной структуре белков, содержащейся в PDB [12]: GGBP (файл 2FW0.ent; [13]), GGBP/Glc (файл 2GBP.ent; [14]), GlnBP (1GGG.ent; [15]) и GlnBP/Gln (1WDN.ent; [16]). Микроокружение триптофановых и тирози-

новых остатков определяли как совокупность атомов, расположенных на расстоянии менее r_0 от геометрического центра индольного или фенольного кольца; r_0 принято равным 7 Å [7]. Выявляли атомы микроокружения, ближайшие к каждому атому индольного или фенольного кольца и расстояние между ними. Плотность упаковки атомов в микроокружении определяли как число атомов, входящих в микроокружение, или как отношение объема, занимаемого атомами микроокружения, к общему объему сферы с радиусом 7 Å. Объем, занимаемый атомами, определяли на основании известных Ван-дер-Ваальсовых радиусов атомов, причем учитывали лишь ту часть объема, которая входит в сферу радиуса 7 Å. Реальный объем, занимаемый атомами, несколько меньше, так как атомы участвуют в образовании химических связей. Тем не менее, для целей данного анализа это не имеет существенного значения. Эффективность безызлучательного переноса энергии рассчитывали согласно Ферстеру [17-21].

Флуоресцентные измерения выполнены с использованием спектрофлуориметрических установок собственного изготовления [22]. Спектры флуоресценции измеряли при возбуждении светом с длинами волн 280 и 297 нм. Для характеристики положения спектров флуоресценции использовался параметр $A = I_{320}/I_{365}$ (I_{320} и I_{365} – интенсивности флуоресценции при длинах волн регистрации 320 и 365 нм, соответственно; см.: [23]). Спектры флуоресценции и параметр A корректировали на спектральную чувствительность установки. Равновесные зависимости различных флуоресцентных характеристик белков от концентрации GdnHCl измеряли после инкубации белка в растворах GdnHCl соответствующей концентрации при 4 °С в течении 24 ч. Концентрацию GdnHCl определяли рефрактометрически [24] с помощью рефрактометра Аббе (ЛОМО, Россия). Все флуоресцентные измерения были выполнены с использованием микрокувет (101.016-QS 5 × 5 мм; Hellma, Германия). Термодинамические характеристики рассчитаны согласно Нолтингу [25].

Вклад тирозиновых остатков в суммарную флуоресценцию белка рассчитывали с помощью выражения:

$$\Delta\lambda_{\text{Тир}} = (I_{\lambda}/I_{365})_{280} - (I_{\lambda}/I_{365})_{297}$$

Анизотропию флуоресценции [26-27] определяли, используя соотношение:

$$r = (I_V^V - GI_H^V)/(I_V^V + 2GI_H^V)$$

где I_V^V и I_H^V – вертикальная и горизонтальная компоненты интенсивности флуоресценции, возбуждаемой вертикально поляризованным светом, G – коэффициент, характеризующий различие чувствительности приемной системы установки к вертикально и горизонтально поляризованному свету ($G = I_V^H / I_H^H$).

Интенсивность флуоресценции гидрофобного зонда АНС регистрировали при $\lambda_{\text{возб}} = 365$ нм и $\lambda_{\text{рег}} = 480$ нм.

Равновесные и кинетические зависимости интенсивности флуоресценции анализировали с помощью метода, основанного на параметрическом представлении двух независимых экстенсивных характеристик системы. В качестве параметра выступала концентрация денатурирующего агента или время, прошедшее после смешения раствора белка и GdnHCl. Этот подход был впервые предложен в работах [28-29] и использовался в нашей лаборатории для изучения процессов сворачивания–разворачивания и доказательства существования промежуточных состояний для ряда белков [30-34], в том числе при изучении данных кинетических экспериментов, когда в качестве параметра выступает время после перевода белка в раствор денатуранта соответствующей концентрации [35-37]. В последние годы этот метод широко используется исследователями других лабораторий [38-39].

Регистрация и анализ кривых затухания флуоресценции. Измерение кривых затухания флуоресценции проводили на импульсной спектрофлуориметрической установке Института цитологии РАН [22]. Кривые затухания флуоресценции анализировали в мультиэкспоненциальном приближении. Расчет проводили по методу наименьших квадратов с использованием алгоритма минимизации Маркуардта [40]. В качестве эталона использовали растворы *p*-терфенила в этиловом спирте или водный раствор *N*-ацетилтриптофанамида [41].

Круговой дихроизм. Измерение спектров КД проводили на спектрополяриметре J-810 (Jasco, Япония). Концентрация белка составляла 0.3 мг/мл. Для измерения спектров КД в дальней УФ-области использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 мм, измерение проводили в области 250 – 190 нм с шагом 0.1 нм. Для измерения спектров КД в ближней УФ-области использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см, измерение проводили в области 340 – 250 нм с шагом 0.1 нм. Для улучшения соотношения сигнал/шум каждый спектр регистрировали 3 – 5 раз и полученные данные усредняли. Спектры КД белков построены с учетом КД соответствующего буферного раствора.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Глутамин-связывающий белок (GlnBP) и D-галактоза/D-глюкоза-связывающий белок (GGBP) из *Escherichia.coli* относятся к обширной группе лиганд-связывающих белков, содержащихся в периплазме бактерий. Основная функция этих белков заключается в связывании различных биологически-активных молекул (сахаров, аминокислот, пептидов и т.д.) и неорганических ионов для их транспорта в клетку. Хотя белки этой группы существенно различаются по размеру и аминокислотной последовательности, все они имеют сходную пространственную структуру: два глобулярных домена связаны шарнирной областью, образованной двумя или тремя пептидными сегментами, в щели между доменами расположен лиганд-связывающий центр. Связывание субстрата приводит к большим структурным изменениям в молекуле белка (рис. 1).

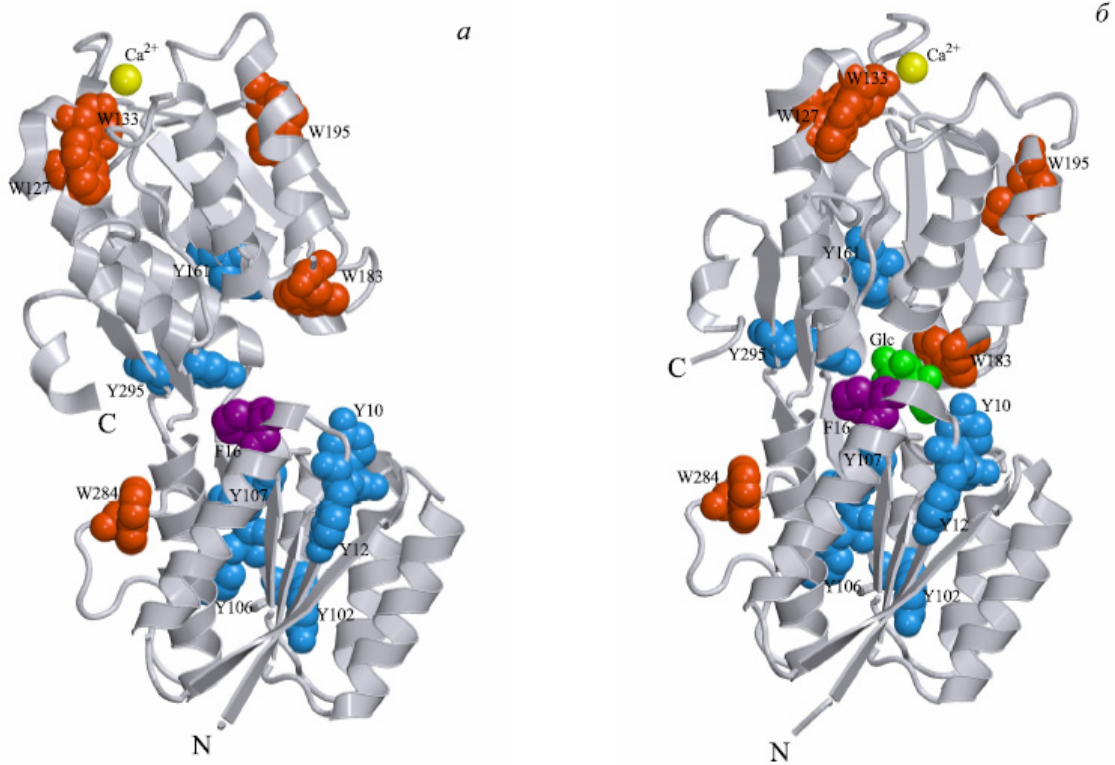
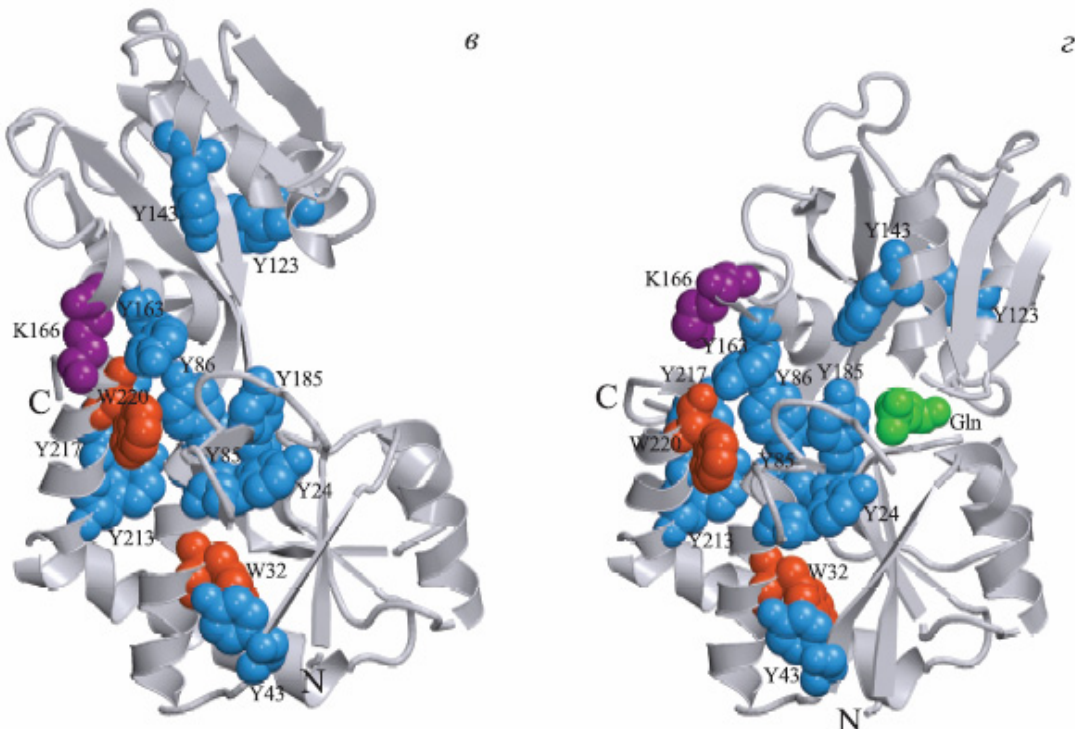


Рис. 1. Пространственная структура GBP (*a*) и комплекса GBP/Glc (*б*), GlnBP (*в*) и комплекса GlnBP/Gln (*г*).

Показана локализация триптофановых (красные) и тирозиновых (синие) остатков. Молекула связанного лиганда, D-глюкозы в случае GBP/Glc (*б*) и Gln в случае GlnBP/Gln (*г*), изображена в зеленом цвете. На панелях *a* и *б* в структуре GBP и GBP/Glc изображен атом Ca^{2+} (желтый) и аминокислотный остаток Phe 16 (фиолетовый), участвующий в связывании D-глюкозы. На панелях *в* и *г* в структуре GlnBP и GlnBP/Gln показан аминокислотный остаток Lys 166 (фиолетовый), входящий в состав микроокружения Trp 220 этого белка. Для построения изображений использовали графические программы VMD [42] и Raster 3D [43]. Рисунок создан на основании данных банка белковых структур [12], файлы 2FW0.ent [13], 2GBP.ent [14], 1GGG.ent [15], и 1WDN.ent [16].



Спектральные свойства GGBP и GlnBP и их комплексов с лигандами

Спектр триптофановой флуоресценции GlnBP в нативном состоянии представляет широкую бесструктурную полосу с максимумом при длине волны 332 нм. При связывании Gln максимум флуоресценции сдвигается в коротковолновую область лишь на 1–2 нм. Сравнительный анализ микроокружения триптофановых остатков GlnBP и его комплекса с Gln позволил объяснить этот эффект тем, что хотя связывание L-глутамин вызывает закрытие щели и существенные структурные изменения с образованием так называемой “закрытой” формы, микроокружение Trp 32 и Trp 220 изменяется незначительно (Kuznetsova et al., 2005; Степаненко и др., 2005).¹

Хотя GlnBP содержит 10 тирозиновых остатков, их вклад в суммарную флуоресценцию нативного GlnBP незначителен. Анализ микроокружения тирозиновых остатков показал, что возможны две причины низкого квантового выхода тирозиновых остатков GlnBP. Во-первых, существуют условия для эффективного переноса энергии от большинства тирозиновых остатков к двум триптофановым остаткам белка Trp 32 и/или Trp 220 непосредственно или через другие тирозиновые остатки. Во-вторых, большинство тирозиновых остатков может быть затушено не только за счет переноса энергии возбуждения на триптофановые остатки, но также близлежащими тушащими группами или переносом энергии на тирозиновые остатки, которые затушены. Для того чтобы проверить существование эффективного переноса энергии от тирозиновых остатков к триптофановым остаткам, была измерена зависимость интенсивности флуоресценции при длине волны регистрации 365 нм (триптофановая флуоресценция) от концентрации GdnHCl при двух длинах волн возбуждения: 280 и 297 нм (рис. 2, з). За единицу принята интенсивность флуоресценции нативного белка при длине волны возбуждающего света, равной 297 нм. Величина интенсивности флуоресценции развернутого белка при длине волны возбуждения 280 нм была принята равной величине интенсивности флуоресценции развернутого белка длине волны возбуждения 297 нм. Следует отметить, что приравнение этих величин оправдано, так как разворачивание белка приводит к потере условий для переноса энергии от тирозиновых остатков к триптофановым остаткам и нивелирует все особенности микроокружения отдельных триптофановых и тирозиновых остатков.

Можно было ожидать, что для нативного белка получим $(I_{280}/I_{297})_{365} > 1$, если при возбуждении светом с длиной волны 280 нм энергия возбужденных триптофановых остатков определяется поглощением самих триптофановых остатков и переносом энергии от тирозиновых остатков (Tyr → Trp). Это отношение может быть равным единице, если нет переноса энергии от тирозиновых к триптофановым остаткам. Однако экспериментально было обна-

¹ Здесь и далее в круглых скобках приводятся ссылки на работы, представленные в списке публикаций по теме диссертации.

ружено, что $(I_{280}/I_{297})_{365} < 1$. Такое соотношение может иметь место только в случае изменения спектра поглощения при разворачивании белка, что может вызывать уменьшение величины $(I_{280}/I_{297})_{365}$, если для коэффициента молярной экстинкции ε справедливо соотношение $(\varepsilon_{280}/\varepsilon_{297})_N < (\varepsilon_{280}/\varepsilon_{297})_U$. Изменение формы спектра поглощения при разворачивании белка должно быть значительным для того, чтобы превзойти эффект, обусловленный уменьшением эффективности переноса энергии $\text{Tyr} \rightarrow \text{Trp}$, который, напротив, приводит к превышению I_{280} над I_{297} .

В работе Акселсена с сотрудниками [44] было показано, что спектр поглощения GlnBP в нативном состоянии имеет необычную форму, а именно, характеризуется наличием небольшого плеча при 293 нм. Это плечо в длинноволновой области спектра поглощения GlnBP было надежно зарегистрировано и в наших экспериментах (рис. 2, *a*). Согласно нашим данным, оно обусловлено большим вкладом в поглощение на длинноволновом краю спектра поглощения GlnBP Trp 220 по сравнению с Trp 32. Этот вывод сделан на основании характера зависимости параметра A от длины волны возбуждения (рис. 2, *b*) и анализа микроокружения триптофановых остатков белка. Как было показано выше, тирозиновые остатки дают незначительный вклад в спектр флуоресценции нативного GlnBP. Вследствие этого зависимость пара-

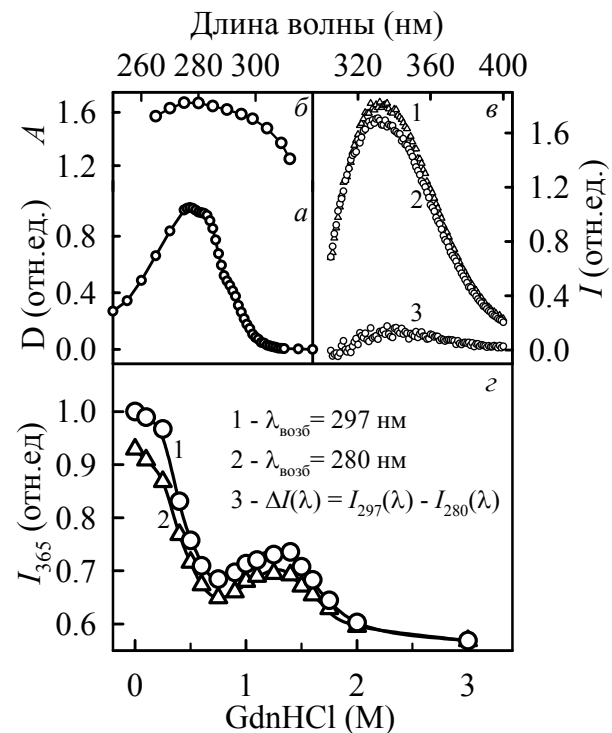


Рис. 2. Спектральные характеристики GlnBP. *a*: Спектр поглощения GlnBP в нативном состоянии. *b*: Зависимость величины параметра A GlnBP в нативном состоянии от длины волны возбуждения. *v*: Спектры флуоресценции GlnBP при длине волны возбуждения 297 (кривая 1) и 280 нм (кривая 2). Кривая 3 – $\Delta I_{\text{возб}}(\lambda) = I_{297}(\lambda) - I_{280}(\lambda)$. *z*: Изменение интенсивности триптофановой флуоресценции ($\lambda_{\text{рег}} = 365$ нм) при возбуждении светом с длинами волн 297 и 280 нм GlnBP в процессе разворачивания белка под действием GdnHCl.

метра A от длины волны возбуждения может определяться только изменением относительного вклада Trp 32 и Trp 220 в суммарную флуоресценцию белка. Характер этой зависимости свидетельствует о том, что вклад триптофанового остатка с более длинноволновым спектром флуоресценции возрастает с увеличением длины волны возбуждающего света. На рис. 2, *v* представлены спектры флуоресценции нативного GlnBP при длинах волн возбуждения 297 и 280 нм (которые построены с учетом определенного нами соотношения $(I_{280}/I_{297})_{365} = 0.93$, см. рис. 2, *z*), а также разностный спектр $I_{297}(\lambda) - I_{280}(\lambda)$:

$\Delta I_{\text{exp}}(\lambda) = I_{297}(\lambda) - I_{280}(\lambda) = \Delta I_{297}(\Delta \varepsilon \text{Trp}220) - \Delta I_{280}(\text{Tyr} \rightarrow \text{Trp}220) - \Delta I_{280}(\text{Tyr} \rightarrow \text{Trp}32)$
 Величина $\Delta I_{\text{exp}}(\lambda)$ представляет ту часть флуоресценции Trp 220, которая определяется превышением поглощения этого остатка на длинноволновом краю спектра поглощения $\Delta I_{297}(\Delta \varepsilon \text{Trp}220)$. Величины $\Delta I_{280}(\text{Tyr} \rightarrow \text{Trp}220)$ и $\Delta I_{280}(\text{Tyr} \rightarrow \text{Trp}32)$ представляют собой части флуоресценции Trp 220 и Trp 32, которые определяются их переходом в возбужденное состояние при переносе энергии от тирозиновых остатков при длине волны возбуждения 280 нм.

Спектр флуоресценции триптофановых остатков более чувствителен к их микроокружению, чем спектр поглощения. Различия спектров поглощения отдельных триптофановых остатков невелики и обычно не принимаются в расчет при анализе флуоресцентных данных. GlnBP – необычный белок, в котором один из двух триптофановых остатков, несомненно, имеет более высокое значение коэффициента молярной экстинкции по сравнению с другим триптофановым остатком в длинноволновой области спектра. Анализ экспериментальных данных и характеристик микроокружения двух триптофановых остатков GlnBP позволил нам сделать вывод о том, что Trp 220 является тем остатком, который вносит больший вклад во флуоресценцию белка при возбуждении на длинноволновом краю спектра поглощения. Пока неясно, как часто такое различие в спектрах поглощения отдельных триптофановых остатков встречается в белках. Таким образом, результаты этой работы свидетельствуют о том, что спектры триптофановой флуоресценции при возбуждении светом с длинами волн 280 нм и 297 нм могут различаться. Этот факт следует учитывать при оценке вклада тирозиновых остатков в суммарную флуоресценцию белка при возбуждении светом с длиной волны 280 нм. Кроме того, этот эффект, очевидно, может являться причиной различий в длинноволновой области спектров флуоресценции некоторых белков (приведенных к интенсивности флуоресценции при длине волны регистрации 365 нм), измеренных при длинах волн возбуждения 280 нм и 297 нм. В этом случае для представления таких спектров в сопоставимых единицах необходимо учитывать величину соотношения $(I_{280}/I_{297})_{365}$. Для определения этого соотношения наряду со спектрами флуоресценции нативного белка необходимо измерять спектры флуоресценции полностью развернутого белка при длинах волн возбуждения 280 нм и 297 нм (Kuznetsova et al., 2005; Степаненко и др., 2005; Степаненко и др., 2007). Существование различий в спектрах поглощения (возбуждения) и спектрах флуоресценции триптофановых остатков может быть полезным при разработке подхода для разложения многокомпонентного белкового спектра флуоресценции на составляющие.

Спектр флуоресценции GGBP в нативном состоянии представляет собой широкую бесструктурную полосу и имеет максимум при длинах волн 344 – 346 нм. При связывании лиганда максимум спектра флуоресценции GGBP сдвигается в коротковолновую область на 4 –

5 нм. В состав белка входят 5 Trp и 7 Tug остатков. Особого внимания заслуживает Trp 183 С-концевого домена, ориентированный внутрь щели, соединяющей два домена белка и служащей для связывания лиганда. Этот остаток и остаток N-концевого домена Phe 16 непосредственно участвуют в связывании сахара в щели между двумя доменами GGBP, формируя ароматический карман из индольного и фенольного колец, между которыми помещается молекула сахара [14]. Именно этот остаток характеризуется наибольшими различиями в составе микроокружения в GGBP и в комплексе GGBP/Glc. Микроокружение Trp 183 GGBP характеризуется высокой полярностью, поскольку насчитывает много гетероатомов полярных остатков, 5 атомов кислорода связанной воды и всего 1 группу неполярного остатка (Ala 155). В состав микроокружения Trp 183 GGBP/Glc по сравнению с микроокружением этого остатка в GGBP дополнительно входят полярные группы OH Tug 10 и OD1 Asp 14, принадлежащие N-концевому домену, и группа OE1 Glu 149. Но, в то же время, микроокружение этого остатка в комплексе GGBP/Glc по сравнению с GGBP содержит на 2 атома кислорода связанной воды меньше. В комплексе GGBP/Glc все атомы углерода и кислорода глюкозы входят в состав микроокружения Trp 183. Плотность микроокружения Trp 183 в комплексе GGBP/Glc выше, чем в GGBP (0.84 и 0.81, соответственно). По-видимому, небольшой коротковолновый сдвиг спектра флуоресценции GGBP/Glc связан с увеличением плотности микроокружения Trp 183 (Степаненко и др., 2007).

Процессы сворачивания и разворачивания GGBP и его комплекса GGBP/Glc

Разворачивание GGBP и GGBP/Glc под действием GdnHCl. Характер равновесных зависимостей различных флуоресцентных характеристик – интенсивности флуоресценции, параметра A , характеризующего положение спектра флуоресценции, и анизотропии флуоресценции (рис. 3 и 4) – свидетельствует об одностадийном разворачивании GGBP и комплекса GGBP/Glc. Линейный вид параметрических зависимостей для GGBP и комплекса GGBP/Glc, построенных на основании зависимостей интенсивности флуоресценции при длинах волн регистрации 320 и 365 нм, также говорит о том, что процесс разворачивания GGBP и комплекса GGBP/Glc происходит по принципу “все или ничего” (рис. 4). Спектры КД в дальней УФ-области, измеренные для GGBP и комплекса GGBP/Glc, совпадают. Это свидетельствует о том, что связывание молекулы D-глюкозы не влияет на вторичную структуру белка. Характер зависимости эллиптичности при 222 нм от концентрации GdnHCl для GGBP и комплекса GGBP/Glc свидетельствует о наличии только одного перехода в процессе денатурации в области 0.3 – 1.5 М GdnHCl и 0.8 – 1.9 М GdnHCl, соответственно (рис. 3). Таким образом, характер изменения спектров КД в дальней УФ-области спектра белка и комплекса с D-глюкозой под действием денатуранта также свидетельствует об одностадийности процесса разворачивания GGBP и GGBP/Glc под действием GdnHCl.

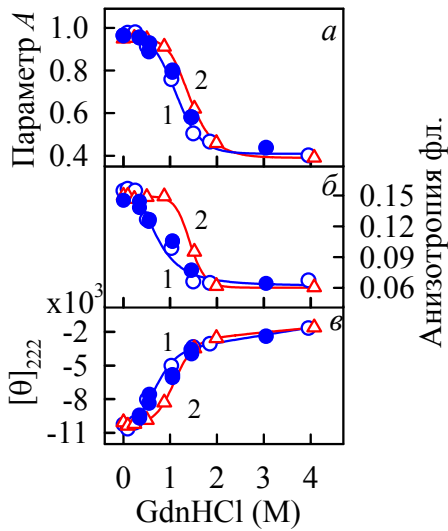


Рис. 3. Конформационные переходы GGBP в отсутствие (кривые 1, кружочки) и в присутствии D-Glc (кривые 2, треугольники) под действием GdnHCl. Открытые символы – разворачивание, закрашенные – сворачивание. *a* – изменение параметра $A = I_{320}/I_{365}$, $\lambda_{\text{возб}} = 297$ нм; *b* – изменение анизотропии флуоресценции, $\lambda_{\text{возб}} = 297$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 365$ нм; *v* – изменение эллиптичности при 222 нм (град $\text{см}^2 \text{дмоль}^{-1}$).

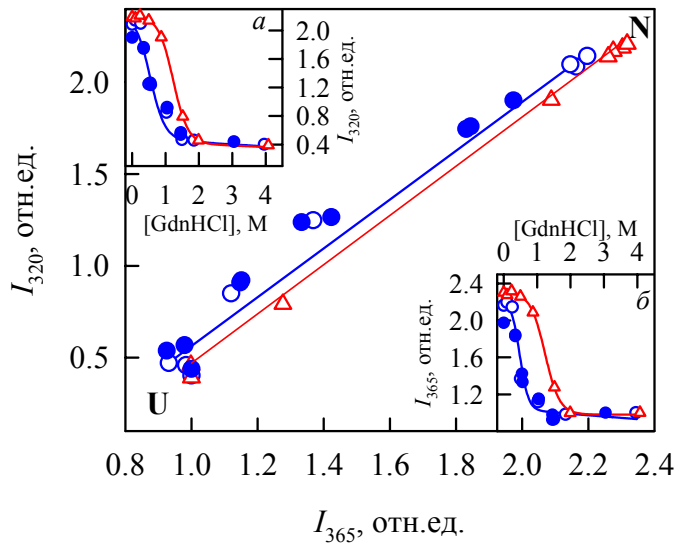


Рис. 4. Параметрические зависимости между интенсивностями флуоресценции при длинах волн регистрации 320 и 365 нм, характеризующие процесс разворачивания GGBP (открытые кружки) и GGBP/Glc (открытые треугольники) под действием GdnHCl. Параметр – концентрация GdnHCl. Темные кружки отвечают процессу ренатурации GGBP. Вставка *a* и *b* – изменение I_{320} и I_{365} в зависимости от концентрации GdnHCl, соответственно. $\lambda_{\text{ex}} = 297$ нм.

Рис. 5. Доля молекул GGBP (верхняя панель) и GGBP/Glc (нижняя панель) в нативном (открытые символы) и развернутом (закрашенные символы) состояниях в зависимости от концентрации GdnHCl. Данные рассчитаны из величины триптофановой флуоресценции при регистрации на 320 (кружки), 350 (квадраты), 365 (треугольники) нм и эллиптичности при 222 нм (ромбы).

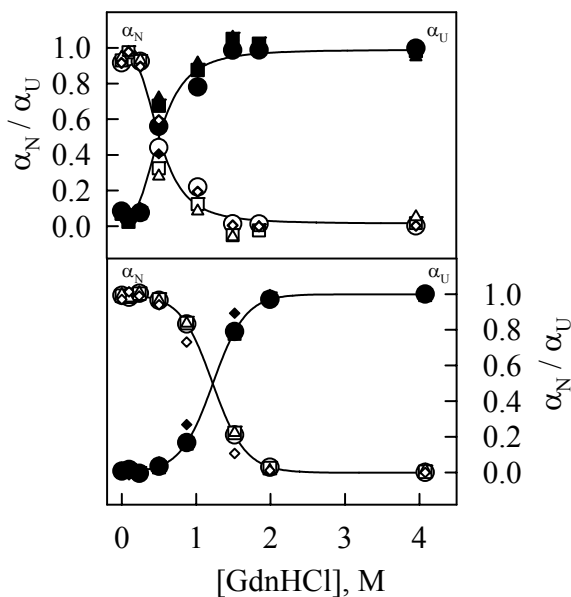
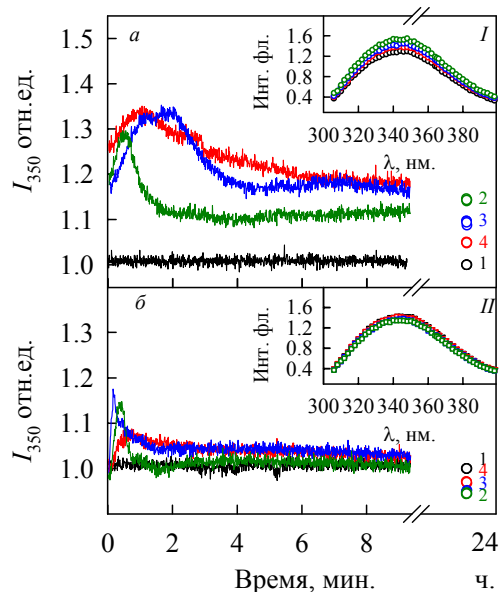


Рис. 6. Влияние EDTA на третичную структуру GGBP (панель *a*) и комплекса GGBP/Glc (панель *b*). Кривые 1, 2, 3 и 4 были измерены для растворов, содержащих 0.0, 0.005, 0.01 и 0.75 мМ EDTA, соответственно. Вставки: Спектры триптофановой флуоресценции GGBP (*I*) и GGBP/Glc (*II*) в нативном состоянии (кривые черного цвета) и в присутствии EDTA разной концентрации: 0.005 (зеленый цвет), 0.01 (синий цвет) и 0.75 мМ (красный цвет). $\lambda_{\text{возб}} = 297$ нм.



Зависимости изменения доли молекул в нативном и развернутом состояниях от концентрации GdnHCl, построенные на основании изменения интенсивности флуоресценции при трех различных длинах волн регистрации и изменения КД при 222 нм, хорошо совпадают как для свободного GGBP, так и для его комплекса с D-глюкозой (рис. 5). Это свидетельствует об одновременном разрушении третичной и вторичной структуры белка и его комплекса с лигандом. Как белок, так и комплекс разворачиваются кооперативно. Середина перехода от нативного к развернутому белку для GGBP и его комплекса с D-глюкозой составляет 0.5 и 1.2 М GdnHCl, соответственно. Таким образом, присоединение лиганда стабилизирует структуру белка. Об этом же свидетельствуют сопоставление величин свободных энергий Гиббса для белка и комплекса – эти величины различаются приблизительно в два раза (Степаненко и др., 2007).

Ренатурация GGBP. Все равновесные зависимости различных флуоресцентных характеристик, таких как интенсивность флуоресценции, параметр A и анизотропия флуоресценции, и КД в дальней УФ-области от концентрации GdnHCl (рис. 3 и 4), полученные при ренатурации GGBP из полностью развернутого состояния (в присутствии 3 М GdnHCl), совпадают с соответствующими кривыми, характеризующими процесс разворачивания белка. Это говорит об обратимости процесса денатурации GGBP под действием GdnHCl (Степаненко и др., 2007).

Отщепление иона кальция. Молекула GGBP содержит один ион кальция, локализованный в петле С-концевого домена (остатки 134 – 142) и образующий координационную связь с атомами кислорода каждого второго остатка этой петли и остатка Glu 205 (рис. 1). Структура кальций-связывающего сайта напоминает структуру мотива “EF-руки”, распространенного во внутриклеточных кальций-связывающих белках [13-14].

Все проведенные эксперименты показали стабилизирующую роль иона кальция в структуре GGBP. Отщепление иона кальция приводит к изменению третичной структуры молекулы GGBP, о чем свидетельствует изменение флуоресцентных свойств GGBP с отщепленным кальцием по сравнению с GGBP. Кинетические зависимости интенсивности флуоресценции, зарегистрированные при исследовании процесса отщепления иона Ca^{2+} от GGBP с помощью ЭДТА, характеризуются увеличением интенсивности триптофановой флуоресценции на 35 % (рис. 6, а). Равновесные значения интенсивности флуоресценции GGBP с удаленным ионом Ca^{2+} , устанавливающиеся за время от 2 до 7 мин после смешения растворов белка и хелатирующего агента, оказались больше соответствующего значения для нативного белка (рис. 6, а и вставка I). В то же время присутствие молекулы связанного сахара Glc делает белок более устойчивым к перестройкам структуры GGBP-Ca/Glc, вызванным удалением иона Ca^{2+} . Отщепление иона Ca^{2+} в значительно меньшей степени влияет на тре-

тичную структуру комплекса GGBP/Glc, о чем свидетельствует меньшая амплитуда увеличения интенсивности триптофановой флуоресценции GGBP/Glc после добавления ЭДТА и достижение равновесных значений регистрируемой характеристики за время меньше 2 мин (рис. 6, б). При этом равновесные значения интенсивности флуоресценции GGBP/Glc с удаленным ионом Ca^{2+} (GGBP-Ca/Glc) совпадают со значением, характерным для комплекса GGBP/Glc (рис. 6, б и вставка II). Эксперименты по кинетике денатурации GGBP-Ca и GGBP-Ca/Glc химическим денатурантом GdnHCl позволили показать, что GGBP-Ca менее устойчив к денатурирующему действию GdnHCl по сравнению с GGBP; в то же время наличие в структуре белка молекулы связанной D-глюкозы повышает устойчивость GGBP-Ca/Glc к денатурирующему действию GdnHCl (Stepanenko et al., 2008).

Процессы сворачивания и разворачивания GlnBP и его комплекса GlnBP/Gln

Разворачивание GlnBP и GlnBP/Gln под действием GdnHCl. Равновесные зависимости интенсивности триптофановой флуоресценции, параметра A , характеризующего положение спектра флуоресценции, анизотропии флуоресценции, величины эллиптичности при длине волны 222 нм, интенсивности флуоресценции АНС и вклада тирозиновых остатков в суммарную флуоресценцию для GlnBP и GlnBP/Gln от концентрации GdnHCl свидетельствуют о сложном процессе разворачивания как GlnBP, так и комплекса белка с лигандом под действием GdnHCl (рис. 7).

Характер зависимостей интенсивности триптофановой флуоресценции при длине волны регистрации 320 нм, параметра A и КД в дальней УФ-области спектра GlnBP от концентрации GdnHCl (рис. 7, вставка I к панели а, б и г), свидетельствует о существовании, по крайней мере, двух переходов при разворачивании белка под действием GdnHCl. Первый переход лежит в области концентраций 0.2 – 0.7 М GdnHCl, а второй – в области 1.4 – 2.1 М GdnHCl. В противоположность GlnBP, зависимости соответствующих характеристик GlnBP/Gln под действием GdnHCl имеют простой сигмоидальный вид, что соответствует модели перехода “все или ничего”. Зависимость интенсивности триптофановой флуоресценции GlnBP от концентрации GdnHCl, измеренная при длине волны 365 нм, характеризуется выраженным увеличением интенсивности флуоресценции в области концентраций GdnHCl 0.7 – 1.1 М, что говорит о более сложном процессе разворачивания GlnBP под действием GdnHCl. В то же время, зависимости анизотропии флуоресценции GlnBP и GlnBP/Gln от концентрации GdnHCl совпадают на всем промежутке концентраций денатуранта от 0.0 до 3.0 М, при этом величина анизотропии флуоресценции остается постоянной вплоть до 1.3 М GdnHCl (рис. 7, в). Постоянство величины анизотропии в области от 0.0 до 1.3 М GdnHCl свидетельствует о том, что белок в этой области концентраций денатуранта сохраняет глобулярную структуру и достаточно жесткое микроокружение триптофановых остатков, которое

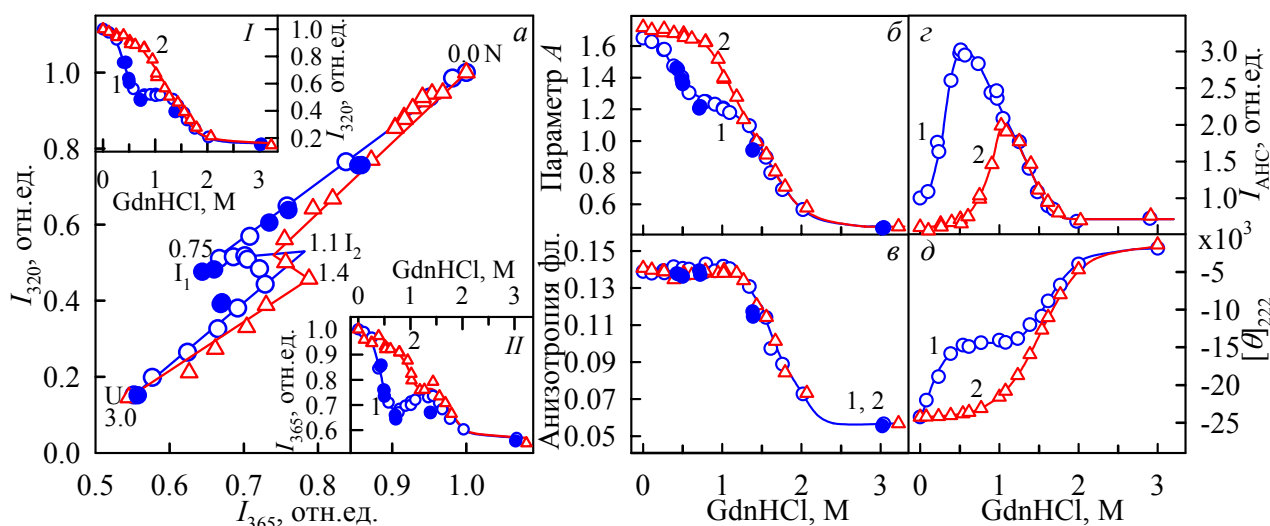


Рис. 7. Конформационные переходы GlnBP (кривые 1, синий цвет) и его комплекса с Gln (кривые 2, красный цвет) под действием GdnHCl. Закрашенные кружки отвечают процессу ренатурации GlnBP.

а – параметрические зависимости между I_{320} и I_{365} , параметр – концентрация GdnHCl. Показаны флуоресцентные характеристики, соответствующие нативному (N), промежуточным состояниям (I_1 и I_2) и полностью развернутому (U) состояниям. Числа на кривых – концентрации GdnHCl. Вставки **I** и **II** – изменение интенсивности флуоресценции при длине волны регистрации 320 и 365 нм, соответственно, $\lambda_{\text{возб}} = 297$ нм; **б** – изменение параметра $A = I_{320}/I_{365}$; $\lambda_{\text{возб}} = 297$ нм; **в** – изменение анизотропии флуоресценции, $\lambda_{\text{возб}} = 297$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 365$ нм; **г** – изменение интенсивности флуоресценции АНС, $\lambda_{\text{возб}} = 365$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 480$ нм; **д** – изменение эллиптичности при 222 нм.

ограничивает внутримолекулярную подвижность индольных колец.

Параметрическое представление результатов измерений равновесных зависимостей интенсивности флуоресценции I_{320} и I_{365} от концентрации GdnHCl и кинетических зависимостей интенсивности флуоресценции I_{320} и I_{365} после перевода белка в раствор GdnHCl соответствующей концентрации свидетельствует о существовании двух промежуточных состояний (I_1 и I_2) на пути перехода GlnBP из нативного в развернутое состояние (рис. 7, а).

Переход $N \rightarrow I_1$ происходит в области концентраций GdnHCl от 0.0 до 0.6 – 0.7 М для GlnBP. Этот переход сопровождается уменьшением интенсивности флуоресценции и величины параметра A , увеличением вклада тирозиновых остатков в суммарную флуоресценцию белка, а также увеличением интенсивности флуоресценции АНС (рис. 7, г). Неизменность величины анизотропии флуоресценции вплоть до 1.3 М GdnHCl предполагает, что в этой области концентраций GdnHCl белок сохраняет глобулярную и довольно жесткую структуру, несмотря на существенное уменьшение сигнала КД в дальней УФ-области. Возможно, сохранение высокого значения анизотропии флуоресценции белка обусловлено ассоциацией денатурированных частично-свернутых молекул белка, возникающих в результате перехода $N \rightarrow I_1$. Существенное увеличение флуоресценции АНС в области перехода $N \rightarrow I_1$, можно связать с возникновением состояния типа “расплавленной глобулы”. Возникновение гидрофобных кластеров на поверхности макромолекулы GlnBP при переходе в состояние типа расплавленной глобулы может являться предпосылкой ассоциации макромолекул.

Переход $I_1 \rightarrow I_2$ хорошо проявляется в равновесной зависимости интенсивности флуоресценции, измеренной при длине волны регистрации 365 нм (рис. 7, *a*, вставка *II*), и в параметрических зависимостях (рис. 7, *a*). Более того, для GlnBP существование I_2 видно из сравнения равновесных зависимостей анизотропии флуоресценции r и интенсивности флуоресценции АНС. Увеличение интенсивности флуоресценции АНС соответствует переходу $N \rightarrow I_1$. Интенсивность флуоресценции АНС начинает уменьшаться до начала разворачивания белка, которое проявляется в уменьшении анизотропии флуоресценции. Разумно предположить, что существует дополнительный переход ($I_1 \rightarrow I_2$), приводящий к уменьшению интенсивности флуоресценции АНС, который предшествует полному разворачиванию белка ($I_2 \rightarrow U$). Переход $I_1 \rightarrow I_2$ происходит в области 0.75–1.1 М GdnHCl. В то же время, ни зависимость интенсивности флуоресценции при длине волны регистрации 320 нм, ни зависимость параметра A от концентрации GdnHCl не дают никаких свидетельств существования перехода в этой области концентраций GdnHCl. Согласно данным КД в дальней УФ-области, вторичная структура белка также не изменяется в этой области концентраций GdnHCl (рис. 7, *d*).

Переход $I_2 \rightarrow U$ происходит в области 1.3–2.4 М GdnHCl. В результате этого перехода разрушается компактная глобулярная структура. Прежде всего, это видно по значительному длинноволновому сдвигу спектра флуоресценции, т.е. по уменьшению параметра A (рис. 7, *b*), что предполагает увеличение полярности микроокружения триптофановых остатков. Уменьшение анизотропии флуоресценции в этой области концентраций GdnHCl (рис. 7, *e*) говорит об увеличении подвижности триптофановых остатков и их микроокружения. Об увеличении подвижности микроокружения триптофановых остатков при этих концентрациях GdnHCl свидетельствует также изменение спектра КД в ближней УФ-области спектра. Существенное уменьшение эллиптичности при 222 нм (рис. 7, *d*) свидетельствует о разрушении вторичной структуры белка в результате данного перехода. Интересно, что уменьшение интенсивности флуоресценции АНС начинается при концентрациях GdnHCl, которые существенно меньше, чем те, при которых начинается переход $I_2 \rightarrow U$. Это косвенно подтверждает существование состояния I_2 . Это также означает, что при переходе в состояние I_2 белок теряет способность связывать АНС.

Так как GlnBP – двухдоменный белок, то мы не можем не учитывать возможности последовательного разворачивания доменов. В то же время переход $N \rightarrow I_1$ нельзя объяснить разворачиванием малого домена (который не имеет триптофановых остатков), так как он сопровождается существенными изменениями флуоресцентных характеристик. С помощью FTIR была показана более низкая термочувствительность α -спиралей белка по сравнению с β -листами [45]. Возможно, α -спирали GlnBP также менее устойчивы к денатурирующему

действию GdnHCl. В этом отношении существенно отметить, что тепловая денатурация (в противоположность разворачиванию под действием GdnHCl) никогда не приводит к полному разворачиванию белка. Таким образом, мы можем предположить, что в нашем случае, переход $N \rightarrow I_1$ сопровождается разворачиванием α -спиралей, тогда как переход $I_1 \rightarrow I_2$ связан с разрушением β -листов (Staiano et al., 2005; Степаненко и др., 2005; Туроверов и др., 2007).

Ренатурация GlnBP. Несмотря на сложный характер разворачивания GlnBP под действием GdnHCl, его денатурация полностью обратима (рис. 7). Все флуоресцентные характеристики GlnBP, такие как параметр A , интенсивность триптофановой флуоресценции и анизотропия флуоресценции, измеренные для растворов белка, содержащих 1.38, 0.71, 0.50 и 0.43 М GdnHCl, не зависят от того, были ли эти растворы получены в процессе денатурации или ренатурации из 3.0 М GdnHCl. Об обратимости процесса разворачивания белка под действием GdnHCl свидетельствует также вид параметрических зависимостей процесса ренатурации GlnBP из 3.02 М GdnHCl, при построении которых параметром выступала концентрация денатуранта (рис. 7, а).

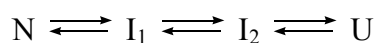
Кинетические кривые процесса ренатурации GlnBP из полностью развернутого состояния (в присутствии 3.02 М GdnHCl), как и равновесные эксперименты, свидетельствуют о том, что, хотя процесс разворачивания GlnBP является сложным, денатурация GlnBP обратима. Параметрическое представление кинетических зависимостей интенсивностей флуоресценции, измеренных при ренатурации белка, показывает, что ренатурация белка, очевидно, проходит через образование тех же промежуточных состояний, что и при денатурации белка (Staiano et al., 2005; Степаненко и др., 2005).

Стабилизация структуры GlnBP при взаимодействии с лигандом. Все экспериментальные данные говорят о том, что структура комплекса GlnBP/Gln более устойчива к денатурирующему действию GdnHCl по сравнению с GlnBP. В самом деле, для GlnBP/Gln переход $N \rightleftharpoons I_1$ происходит при более высокой концентрации GdnHCl (рис. 7). Это означает, что процессы $N \rightleftharpoons I_1$, $I_1 \rightleftharpoons I_2$ и $I_2 \rightleftharpoons U$ происходят в более узкой области концентраций GdnHCl. В результате связывания Gln разворачивание белка становится более кооперативным и белок выдерживает большие концентрации GdnHCl. Это создает видимость того, что процесс денатурации GlnBP/Gln происходит с образованием только одного промежуточного состояния. Тем не менее, характер параметрических зависимостей между I_{320} и I_{365} (рис. 7, а) однозначно показывает, что процесс разворачивания GlnBP/Gln, так же как и GlnBP, является трехстадийным.

Таким образом, разворачивание GlnBP под действием GdnHCl является трехстадийным и обратимым. Связывание лиганда (Gln) приводит к тому, что структура белка становится более устойчивой к денатурирующему действию GdnHCl. Это, в свою очередь, приводит к

кооперативному разворачиванию структуры по достижении соответствующей концентрации денатуранта (Степаненко и др., 2005; Staiano et al., 2005). Возрастание интенсивности флуоресценции АНС при разворачивании GlnBP под действием GdnHCl (переход $N \rightleftharpoons I_1$), по-видимому, связано с образованием ассоциатов макромолекулы белка после их перехода в состояние типа расплавленной глобулы (Staiano et al., 2005; Степаненко и др., 2005).

Сравнение характера процессов разворачивания–сворачивания GGBP с GlnBP. Оба белка, GlnBP и GGBP, относятся к одному семейству лиганд-связывающих белков периплазмы бактерий и имеют сходную третичную структуру, несмотря на различие аминокислотной последовательности и молекулярной массы (25 кДа для GlnBP и 33 кДа для GGBP). Величины свободной энергии для этих белков близки по значению. Комплексообразование GlnBP с глутамином и GGBP с D-глюкозой делает белки более термостабильными. Установлено, что температурная денатурация как GlnBP и GGBP, так и их комплексов со своими лигандами является необратимой. Характер разворачивания GGBP и GlnBP под действием GdnHCl существенно различается. Как было показано, GlnBP и GlnBP в комплексе с глутамином разворачивается по трехстадийному механизму. Совокупность данных, полученных методом собственной флуоресценции белков, флуоресценции АНС, данных КД в дальней УФ-области, а также использование параметрического представления флуоресцентных данных позволили предложить следующую схему для разворачивания как GlnBP, так и GlnBP/Gln под действием GdnHCl:



где N – нативное состояние, U – развернутое состояние, I_1 и I_2 – промежуточные состояния, возникающие на пути перехода из нативного в развернутое состояние. В присутствии глутамина структура GlnBP становится более термостабильной и более устойчивой к денатурирующему действию GdnHCl. Несмотря на сложный характер процесса разворачивания GlnBP, он полностью обратим.

В то же время разворачивание как GGBP, так и его комплекса GGBP/Glc является одностадийным процессом. Более кооперативный характер денатурации GGBP по сравнению с GlnBP, возможно, вызван присутствием иона Ca^{2+} в структуре GGBP. Макромолекула GGBP сохраняет нативное состояние, пока ион Ca^{2+} не отщепляется под действием GdnHCl или нагревания. Таким образом, разворачивание GGBP начинается при более высокой концентрации GdnHCl (температуре) по сравнению с GlnBP, и переход осуществляется более кооперативно. Разрушение GGBP/Glc начинается при еще более высокой концентрации GdnHCl (температуре) после удаления второго лиганда – молекулы сахара (Степаненко и др., 2005; Kuznetsova et al., 2005; Staiano et al., 2005; Степаненко и др., 2007).

ВЫВОДЫ

1. Связывание лиганда стабилизирует структуру глутамин-связывающего белка и D-галактоза/D-глюкоза-связывающего белка и делает процесс их разворачивания более кооперативным, однако не влияет на путь разворачивания белка и число возникающих при этом промежуточных состояний.
2. Несмотря на сходство структуры глутамин-связывающего белка и D-галактоза/D-глюкоза-связывающего белка, характер процессов разворачивания этих белков существенно различается:
 - разворачивание глутамин-связывающего белка под действием гуанидингидрохлорида является трехстадийным, т.е. проходит с образованием двух промежуточных состояний I_1 и I_2 .
 - процесс разворачивания D-галактоза/D-глюкоза-связывающего белка под действием гуанидингидрохлорида является одностадийным.
3. Разворачивание глутамин-связывающего белка и D-галактоза/D-глюкоза-связывающего белка под действием гуанидингидрохлорида является обратимым, а тепловая денатурация необратима.
4. Существенное увеличение интенсивности флуоресценции гидрофобного красителя 1-анилинонафталин-8-сульфоната при переходе в первое промежуточное состояние I_1 , возникающее при разворачивании глутамин-связывающего белка, связано с образованием состояния типа “расплавленной глобулы”. Возникновение гидрофобных кластеров на поверхности макромолекулы глутамин-связывающего белка при переходе в это состояние сопровождается ассоциацией макромолекул.
5. Несмотря на значительные структурные преобразования, происходящие в глутамин-связывающем белке и D-галактоза/D-глюкоза-связывающем белке при связывании соответствующих лигандов, характеристики их триптофановой флуоресценции при этом изменяются незначительно.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Kuznetsova I.M., **Stepanenko Olga V.**, Turoverov K.K., Staiano M., Scognamiglio V., Rossi M., D'Auria S. (2005). Fluorescence properties of glutamine-binding protein from *Escherichia coli* and its complex with glutamine. *J. Proteome Res.* 4 (2):417-23.
2. Staiano M., Scognamiglio V., Rossi M., D'Auria S., **Stepanenko Olga V.**, Kuznetsova I.M., Turoverov K.K. (2005). Unfolding and refolding of the glutamine-binding protein from *Escherichia coli* and its complex with glutamine induced by guanidine hydrochloride. *Biochemistry.* 44 (15):5625-33.
3. **Степаненко Ольга В.**, Кузнецова И.М., Туроверов К.К., Скогнамиглио В., Стаяно М., Д'Ауриа С. (2005). Структура и стабильность глутаминсвязывающего белка из *Escherichia coli* и его комплекса с глутамином. *Цитология.* 47 (11): 988-1006.
4. Туроверов К.К., Поварова О.И., **Степаненко Ольга В.**, Кузнецова И.М. (2007). Термодинамически стабильные, компактные состояния белков: образование нативной структуры в процессе фолдинга, аморфных агрегатов, амилоидных и амилоидо-подобных фибриллярных структур при его нарушении. В сб. "Бреслеровские чтения. Молекулярная генетика, биофизика и медицина сегодня". Ред. В.А. Ланцов. СПб.: ПИЯФ РАН, 78-87.
5. **Степаненко Ольга В.**, Кузнецова И.М., Туроверов К.К., Скогнамиглио В., Стаяно М., Д'Ауриа С. (2007). Влияние лиганда на стабильность и процессы фолдинга двухдоменных лиганд-связывающих белков. *Вестник молодых ученых. Выпуск IV.* М.: СП "Мысль". 42-52.
6. **Степаненко Ольга В.**, Кузнецова И.М., Стаяно М., Д'Ауриа С. (2004). Анализ микроокружений триптофановых и тирозиновых остатков и спектральные свойства GlnBP. 8-я международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых, Пушкино, 34.
7. **Степаненко Ольга В.**, Кузнецова И.М., Туроверов К.К., Скогнамиглио В., Стаяно М., Д'Ауриа С. (2004). Сравнительное изучение структуры и стабильности глутаминсвязывающего белка и его комплекса с глутамином. III Съезд биофизиков России, Воронеж, 105.
8. Parracino A., Scognamiglio V., Staiano M., Varriale A., Rossi M., D'Auria S., Kuznetsova I.M., **Stepanenko Olga V.**, Turoverov K.K. (2004). Glutamine-binding protein from *E.coli*: location of tryptophan and tyrosine residues, characteristics of their microenvironments, and their contribution to the bulk fluorescence of the protein. *The Italian Journal of Biochemistry.* V. 53, suppl. 1, 104.
9. **Степаненко Ольга В.**, Кузнецова И.М., Туроверов К.К., Скогнамиглио В., Стаяно М., Д'Ауриа С. (2007). Влияние лиганда на стабильность и процессы фолдинга двухдоменных лиганд-связывающих белков. XIV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2007", Москва, т. I, 76.
10. **Stepanenko Olga V.**, Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Scognamiglio V., Staiano M., Rossi M., D'Auria S. (2007). Peculiarities of folding processes of ligand binding protein: D-galactose/D-glucose-binding protein and glutamine-binding protein. XIIth European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Bobigny, France, 190.
11. **Степаненко Ольга В.** (2007). Фолдинг и стабильность двухдоменных лиганд-связывающих белков – чувствительных элементов социально значимых биосенсоров. Двенадцатая Санкт-Петербургская ассамблея молодых ученых и специалистов. Тезисы докладов, Санкт-Петербург, 42.
12. **Stepanenko Olga V.**, Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Scognamiglio V., Staiano M., D'Auria S. (2008). The role of calcium ion in the structure of D-galactose/D-glucose-binding protein. 4th Saint-Petersburg young scientists conference. Abstract book, Saint-Petersburg, 73.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harper J.D., Lansbury P.T.Jr. 1997. *Ann. Rev. Biochem.* 66: 385 – 407.
2. Carrell R.W., Gooptu B. 1998. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 799 – 809.
3. Fink A. L. 1998. *Fold. Des.* 3: 9 – 23.
4. Uversky V.N. et al., 1999a. *Medical Science Monitor.* 5: 1001 – 1012.
5. Uversky V.N. et al., 1999b. *Medical Science Monitor* 5: 1238 – 1254.
6. Selkoe D.J. 2003. *Nature.* 426: 900 – 904.
7. Wetzel R. 1994. *Trends Biotechnol.* 12: 193 – 198.
8. Speed M.A. et al., 1996. *Nat. Biotechnol.* 14: 1283 – 1287.
9. Dattelbaum J.D., Lakowicz J. R. 2001. *Anal. Biochem.* 291: 89 – 95.
10. Staiano M. et al., 2004. *Biotechnology Progress.* 20(5): 1572 – 1577.
11. Tolosa L. et al., 1999. *Anal. Biochem.* 267: 114 – 120.
12. Berman H.M., et al., 2000. *Nucleic Acids Research.* 28 (1): 235 – 242.
13. Borrok M.J. et al., 2007. *Prot. Sci.* 16(6): 1032–1041.
14. Vyas N.K. et al., 1988. *Science.* 242: 1290–1295.
15. Hsiao C.-D. et al., 1996. *J. Mol. Biol.* 262: 225–242.
16. Sun Y. et al., 1998. *J Mol. Biol.* 278: 219–229.
17. Turoverov K.K. et al., 1985. *Biophys. Chem.* 23: 79–89.
18. Forster Th. 1960. *Rad. Res. Suppl.* 2: 326–339.
19. Dale R.E., Eisinger J. 1974. *Biopolymers* 13: 1573–1605.
20. Eisinger J. et al., 1969. *Biochemistry.* 8: 3908–3915.
21. Steinberg I.Z. 1971. *Ann. Rev. Biochem.* 40: 83–114.
22. Туроверов К.К. и др., 1998. *Цитология.* 40 (8/9): 806–817.
23. Туроверов К.К., Kuznetsova I.M. 2003. *J. Fluorescence* 13: 41 – 57.
24. Pace C.N. 1986. *Methods Enzymol.* 131: 266 – 280.
25. Nolting B. 1999. *Protein Folding Kinetics. Biophysical Methods.* Berlin-Haidelberg: Springer-Verlag, 191 p.
26. Jablonski A. 1957. *Acta Phys. Polon.* 16: 471 – 479.
27. Лакович Дж. 1986. *Основы флуоресцентной спектроскопии.* М.: Мир. стр. 136 – 139.
28. Бурштейн Э. А. 1976. *Люминесценция белковых хромофоров.* Сер. Биофиз, Т.7, ВИНТИ, Москва.
29. Капланас Р.И. и др., 1975. *Мол. Биол.* 9: 795 – 804.
30. Bushmarina N. A. et al., 2001. *Chem. Bio. Chem.* 2: 813 – 821.
31. Kuznetsova I. M., Stepanenko Olga V. et al., 2002a. *Biochem. Biophys. Acta.* 1596: 138 – 155.
32. Kuznetsova I.M. et al., 2004. *J. Proteome Res.* 3: 485 – 494.
33. Stepanenko Olga V. et al., 2004. *Biochemistry.* 43: 5296 – 5303.
34. Кузнецова И.М., Степаненко Ольга В. и др., 2005. *Цитология.* 47 (11): 1007 – 1016.
35. Kuznetsova I.M., Stepanenko Olga V. et al., 2002b. *Biochemistry.* 41: 13127 – 13132.
36. Туроверов К.К., Kuznetsova I.M. 2003. *J. Fluorescence* 13: 41 – 57.
37. Поварова О.И. и др., 2005. *Цитология.* 47: 935 – 977.
38. Altschuler G.M. et al., 2005. *J.Mol.Biol.* 353(2): 385 – 396.
39. Das P. et al. 2005. 102(41): 14569 – 14574.
40. Marquardt D.W. 1963. *J. Soc. Indust. Apl. Math.* 11: 431–441.
41. Zuker M. et al., 1985. *Rev. Sci. Instrum.* 56: 14–22.
42. Humphrey W. et al., 1996. *J. Molec. Graphics* 14: 33 – 38.
43. Merritt E.A., Bacon D.J. 1977. *Methods enzymol.* 277: 505 – 524.
44. Axelsen P.H. et al., 1991. *Biophys. J.* 60: 650–659.
45. D’Auria S. et al., 2005. *Proteins.* 58: 80 – 87.