



УДК 577.3

## ДЕНАТУРИРОВАННОЕ СОСТОЯНИЕ ЛИЗОЦИМА В ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДЕ

© 1996 г. М. Д. Киркитадзе, А. К. Сурин, С. А. Потехин<sup>#</sup>

Институт белка РАН, 142292, Пущино Московской обл.

Поступила в редакцию 26.04.95 г.

Методами флуоресценции и дисперсии оптического вращения исследовано влияние диметилсульфоксида (DMSO) на структуру лизоцима. Показано, что при концентрации DMSO выше 60% происходит изменение структуры лизоцима, сопровождающееся увеличением степени спиральности молекулы. Однако по критериям доступности собственных хромофоров растворителю и их подвижности это состояние лизоцима не отличается от состояния неструктурированных пептидов, полученных путем его исчерпывающего протеолиза. На основании полученных данных делается вывод о незначительной роли дальних взаимодействий в поддержании остаточной вторичной структуры лизоцима в DMSO.

*Ключевые слова:* лизоцим, денатурированное состояние, вторичная структура; диметилсульфоксид.

Структурное описание промежуточных состояний, реализующихся при спонтанном сворачивании белков, чрезвычайно важно для понимания механизма их самоорганизации [1 - 6]. Однако кинетические интермедиаты в большинстве случаев имеют слишком короткое время жизни для проведения их полномасштабного изучения [6, 7]. Попытки найти экспериментальные условия, в которых такие промежуточные состояния становятся стабильными, могут оказаться намного более плодотворными. Исследования последних лет позволили обнаружить несколько частично свернутых равновесных форм убиквитина [8], РНКазы [9 - 11] и других белков [6, 12], индуцированных добавлением низкомолекулярных спиртов. Некоторые из этих состояний по своим физико-химическим параметрам напоминают "расплавленную" глобулу [13 - 15]. Белки в этом состоянии характеризуются вторичной структурой, близкой к нативной, и достаточно малыми по сравнению с развернутым белком размерами. Однако внутримолекулярная подвижность белков этом случае существенно превышает их подвижность в нативном состоянии за счет ослабления дальних взаимодействий [12]. Последнее отражается как на спектрах КД в ближнем УФ, так и на кинетике  $^1\text{H}-^2\text{H}$ -обмена [8, 10, 11].

Механизмы стабилизации промежуточных форм белков низкомолекулярными спиртами неясны. Кроется ли природа этого явления в специфических свойствах молекул растворителя данного класса или она заключается в изменении

свойств раствора общего характера, например в уменьшении диэлектрической проницаемости среды? Чтобы ответить на этот вопрос, необходимо изучить структуру денатурированных белков в органических растворителях, принадлежащих разным классам.

Под денатурацией лизоцима понимается его конформационный переход в любую из биологически неактивных форм со структурой, отличной от нативной.

Цель данной работы – изучение структурных особенностей лизоцима, денатурированного DMSO, методами ДОВ и флуоресценции.

Для контроля за уровнем вторичной структуры использовали метод ДОВ. Метод КД оказался неприемлемым ввиду сильного поглощения DMSO в информативной области спектра ( $\lambda < 300$  нм).

Чтобы выяснить, при какой концентрации DMSO происходит конформационный переход у лизоцима, была исследована зависимость параметра  $b_0$  (уравнение Моффита–Янга [16]) от концентрации DMSO при pH 2.5. Как было показано ранее [16], абсолютная величина этого параметра прямо пропорциональна степени спиральности белков, а сам параметр  $b_0$  может быть использован для наблюдения за изменением уровня вторичной структуры белков как в водных, так и в органических растворителях. На рис. 1 приведены результаты этих экспериментов. Наблюдаемое небольшое уменьшение  $b_0$  в диапазоне концентраций DMSO 0 - 40% вряд ли связано с какими-либо существенными конформационными изменениями белка и отражает зависимость

<sup>#</sup> Автор для переписки.

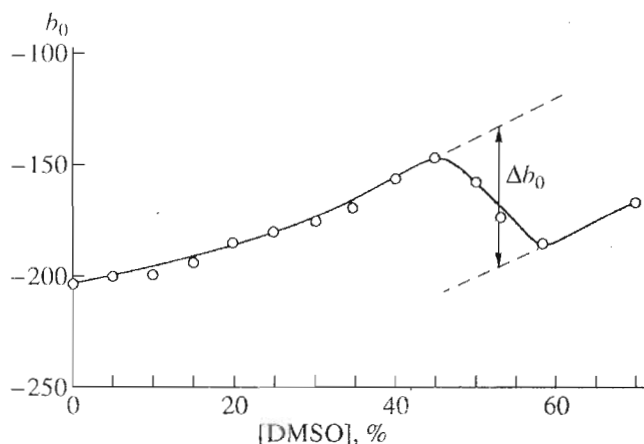


Рис. 1. Зависимость параметра Моффита-Янга ( $b_0$ ) для лизоцима от концентрации DMSO при pH 2.5 и 25°C.

параметра  $b_0$  от внешних условий для данной структуры. Далее, в области 40 - 60%, происходит конформационный переход, сопровождающийся существенными изменениями структурных параметров лизоцима. Обнаруженный переход происходит при более низких концентрациях DMSO, чем это обнаружено калориметрическим методом. Как показано ранее, это расхождение обусловлено кинетическими причинами, связанными с существенным замедлением скорости денатурации при высоких концентрациях DMSO [17, 18].

Так или иначе, при концентрации DMSO выше 60% и комнатной температуре лизоцим находится в денатурированном состоянии. Следует обратить внимание на то, что денатурация, индуцированная DMSO, происходит с увеличением абсолютной величины  $b_0$ , а следовательно, с увеличением степени спиральности лизоцима.

Исследована также зависимость параметра  $b_0$  от концентрации DMSO для смеси коротких пептидов, полученных путем трипсинолиза лизоцима. Получены значения  $b_0$  при концентрации DMSO от 10 - 40%, равные -57, т.е. степень спиральности составила 9%. При 60 - 70%  $b_0$  равно -76, что соответствует 12% спиральности, в отличие от водного раствора, где у коротких пептидов спиральность составила 5%.

Известно, что добавление спиртов, таких, как трифторэтанол и метанол, вызывает стабилизацию спиральной конформации пептидов. В частности, показано, что синтетический  $\alpha$ -пептид  $\delta$ -эндотоксина *Bacillus thuringiensis* в 100% метаноле имеет  $\alpha$ -спиральную конформацию, тогда как в воде он представляет собой развернутый клубок [19]; S-пептид рибонуклеазы А (остатки 1 - 19) в присутствии трифторэтанола образует стабильную  $\alpha$ -спираль [20]; фрагмент  $\beta$ -листа лизоцима

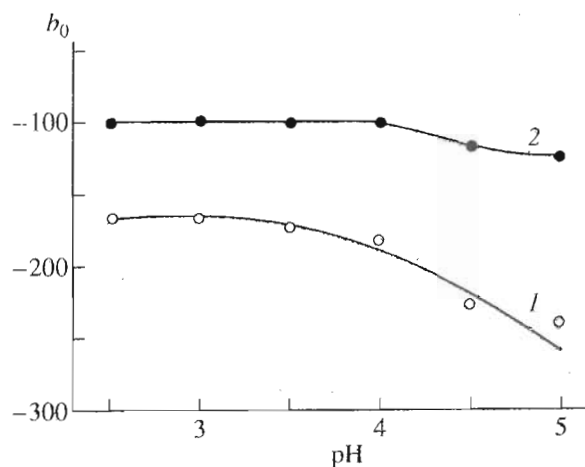


Рис. 2. Зависимость параметра Моффита-Янга ( $b_0$ ) для лизоцима в 70% DMSO от pH при 25 (1) и 70°C (2).

куриного яйца в 50% трифторэтаноле и при pH 2 обнаруживает 18% спиральности [21]. Авторы этих работ полагают, что появление дополнительных заряженных групп, вызванное понижением константы диэлектрической проницаемости водно-спиртовой смеси по сравнению с водой, - одна из причин возникновения  $\alpha$ -спиральной конформации в изученных пептидах.

Чтобы оценить влияние электростатических взаимодействий на спиральность структуры денатурированного белка, нами была получена зависимость степени спиральности от pH среды при двух температурах (рис. 2). При достаточно низкой температуре влияние pH на структуру оказывается существенным, хотя повышение температуры нейтрализует этот эффект. Следовательно, появление заряженных групп стабилизирует спиральные участки, но дополнительная энергия стабилизации спиральных структур достаточно низка. Таким образом, понижение диэлектрической проницаемости среды - одна из причин дополнительной спирализации в присутствии DMSO.

Принципиально важной характеристикой белка в денатурированном состоянии является его компактность и степень гидратированности боковых групп. Эти параметры отражают роль дальних взаимодействий в поддержании данной частично структурированной конформации. К сожалению, для оценки степени компактности молекулы гидродинамические методы нельзя применить в данном случае из-за неньютоновского характера растворов DMSO. Чтобы выяснить, насколько подвижны и доступны растворителю боковые группы в денатурированном состоянии лизоцима, была исследована флуоресценция триптофанов лизоцима при разных концентрациях DMSO в отсутствие и присутствии акрил-амина - тушителя флуоресценции.

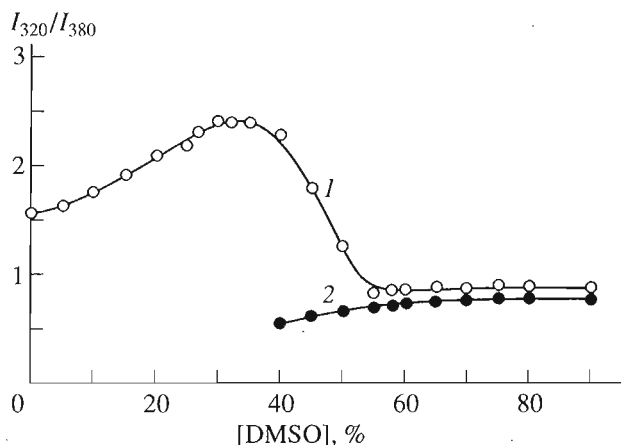


Рис. 3. Зависимость от концентрации DMSO отношения интенсивностей собственной флуоресценции триптофанов лизоцима (1) и продуктов его трипсинолиза (2) при длинах волн 320 и 380 нм.

На рис. 3 приведены результаты этих экспериментов в виде зависимостей отношения интенсивностей при двух длинах волн ( $I_{320}/I_{380}$ ) от концентрации DMSO. Там же дана эта зависимость для смеси коротких пептидов, полученных путем трипсинолиза лизоцима. Размеры триптофансодержащих пептидов малы (не более 22 остатков, согласно оценке, сделанной на основании расположения аргининов и лизинов в первичной структуре белка [22]), что исключает экранирование триптофанов в пептидах от растворителя. Вначале, вплоть до 40% DMSO, для лизоцима наблюдается небольшой рост отношения интенсивностей вследствие уменьшения полярности растворителя. Как и в случае с использованием ДОВ (рис. 1), конформационный переход фиксируется в области 40 - 60% DMSO. При дальнейшем повышении концентрации DMSO отношения интенсивностей флуоресценции для лизоцима и продуктов его трипсинолиза практически совпадают, что свидетельствует об отсутствии компактной структуры в белке. Аналогичное совпадение этих зависимостей наблюдается и при изучении тушения флуоресценции акриламидом (рис. 4). Следовательно, в присутствии DMSO молекула лизоцима переходит в состояние, где подвижность и доступность хромофоров не отличается от их подвижности и доступности в коротких пептидах.

Суммируя вышеизложенное, можно утверждать, что повышение концентрации DMSO приводит к стабилизации остаточной вторичной структуры лизоцима. Учитывая ранее опубликованные данные [23], такой результат воздействия органических растворителей можно считать достаточно общим. Однако степень компактности денатурированного состояния может существенно различаться. Если, например, в рибонуклеазе А в присутствии 35 - 50% метанола наблюдается ком-

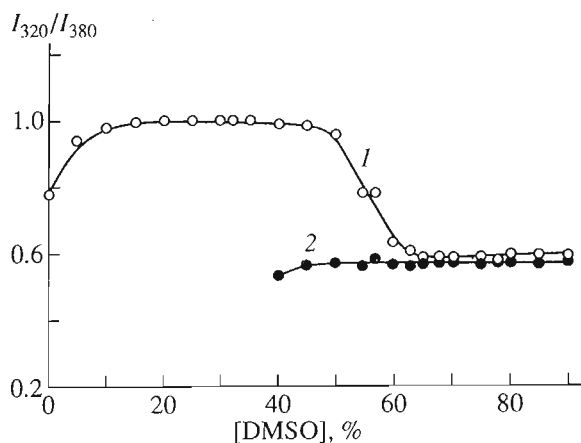


Рис. 4. Зависимость от концентрации DMSO эффективности тушения акриламидом собственной флуоресценции триптофанов лизоцима (1) и продукта трипсинолиза (2).

пактное промежуточное состояние типа “расплавленной” глобулы [10], то лизоцим в растворах низкомолекулярных спиртов [23], а также в растворах DMSO компактной структурой не обладает.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Лизоцим куриного яйца** (“Реахим”, марка Б) был дополнительно дважды перекристаллизован. Чистоту препарата проверяли электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия при pH 8.3 [24, 25]. Количество примесей не превышало 5%. В эксперименте использовали DMSO фирмы Serva (ФРГ).

**Концентрацию белка** в водных растворах измеряли спектрофотометрически с использованием коэффициента поглощения лизоцима  $A_{1\text{см}, 280}^{1\%} = 26.7$  для водного раствора. Коэффициенты поглощения лизоцима при различных концентрациях DMSO определяли из светопоглощения растворов, полученных путем добавления необходимого количества DMSO к водному раствору белка с известной концентрацией.

**Дисперсию оптического вращения (ДОВ)** измеряли на поляриметре Perkin-Elmer-141 (США) при 25°C и концентрации белка 8 - 10 мг/мл. Длина оптического пути в ячейке равнялась 100 мм при объеме 1 мл. Результаты обрабатывали по описанному методу [18].

**Собственную флуоресценцию** измеряли на коррекционном спектрофлуориметре Aminco SPF-100CS (США) при 23°C и концентрации белка 0.1 - 0.3 мг/мл. Длина оптического пути в ячейке составляла 10 мм.

**Исчерпывающий трипсинолиз лизоцима** проводили по описанной методике [26]. Весовое соотношение фермент/субстрат составляло 1/50.

Реакцию останавливали добавлением 10 мМ фенолметилсульфонилфторида. Степень гидролиза контролировалась электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

Работа выполнена при поддержке грантами Международного научного фонда (№ MVE000), Российского фонда фундаментальных исследований (№ 94-04-11787-а) и Российской академии наук.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nelson J.W., Kallenbach N.R. // *Biophys. J.* 1987. V. 51. P. A555.
2. Lustig B., Fink A.L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1992. V. 1119. P. 205 - 210.
3. Buck M., Radford S.E., Dobson C.M. // *Biochemistry.* 1993. V. 32. P. 669 - 678.
4. Fu L., Freire E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. P. 9335 - 9338.
5. Ben-Naim A. // *Biopolymers.* 1990. V. 29. P. 567 - 596.
6. Pitytsin O.B., Semisotnov G.V. // *Conformations and Forces in Protein Folding* / Eds B.T. Nall, K.A. Dill. Washington: AAAS Publ., 1991. P. 155 - 168.
7. Kim P.S., Baldwin R.L. // *Annu. Rev. Biochem.* 1990. V. 59. P. 631 - 650.
8. Pan Y., Briggs M.S. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. P. 11405 - 11412.
9. Lustig B., Fink A.L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1992. V. 1121. P. 229 - 233.
10. Biringer R.G., Fink A.L. // *J. Mol. Biol.* 1982. V. 160. P. 87 - 116.
11. Fink A.L., Painter B. // *Biochemistry.* 1987. V. 26. P. 1665 - 1671.
12. Семисотнов Г.В., Кутышченко В.П., Птицын О.Б. // *Молекуляр. биология.* 1989. V. 23. P. 808 - 812.
13. Alexandrescu A.T., Ng Y.-L., Dobson C.M. // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 235. P. 587 - 599.
14. Smith L.J., Alexandrescu A.T., Pitkeathly M., Dobson C.M. // *Structure.* 1994. V. 2. P. 703 - 712.
15. Blanko F.L., Jimenez M.A., Pineda A., Rico M., Santoro J., Nieto J.L. // *Biochemistry.* 1994. V. 33. P. 6004 - 6014.
16. Yang J.T. // *Poly- $\alpha$ -amino-acids* / Ed. G.D. Fasman. N.Y., 1967. P. 239 - 288.
17. Ковригин Е.Л., Потехин С.А. // *Биофизика.* 1996. Т. 41. Вып. 2.
18. Ковригин Е.Л., Куркутадзе М.Д., Потехин С.А. // *Биофизика.* 1996. Т. 41. Вып. 2.
19. Cummings C.E., Armstrong G., Hodgman T.Ch., Ellar D.J. // *Mol. Membrane Biol.* 1994. V. 11. P. 87 - 92.
20. Nelson J.W., Kallenbach N.R. // *Proteins.* 1986. V. 1. P. 211 - 217.
21. Yang J.J., Pitkeathly M., Radford S.E. // *Biochemistry.* 1994. V. 33. P. 7345 - 7353.
22. *Atlas of Protein Sequence and Structure.* McGregor & Werner Inc. USA, 1967. V. 3. P. 221.
23. Shimaki N., Ikeda K., Hamauchi K. // *J. Biochem.* 1970. V. 68. P. 795 - 803.
24. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680 - 685.
25. Maizel J.V. // *Methods Virol.* 1971. V. 5. P. 179 - 192.
26. *Практическая химия белка: Пер. с англ.* / Ред. А. Дарбре. М.: Мир, 1989. С. 147 - 149.

## Denatured State of Lysozyme in Dimethyl Sulfoxide

M. D. Kirkitadze, A. K. Surin, and S. A. Potekhin<sup>1</sup>

*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast. 142292 Russia*

**Abstract**—An influence of DMSO on lysozyme structure in solution was studied by fluorescence and optical rotary dispersion methods. Change in the protein structure was shown to proceed at DMSO concentration in water greater than 60% and result in an increase of the protein helicity. However, this structural state of lysozyme is similar to that of the unstructured peptides obtained by its complete proteolysis and is characterized by parameters of accessibility to solvent and mobility of their intrinsic chromophores. The data obtained evidenced that long range interactions have a little influence on the maintenance of the residual secondary structure of lysozyme in the presence of DMSO.

*Key words:* lysozyme, denatured state, secondary structure; dimethyl sulfoxide.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.