



УДК 577.3

ЧАСТИЧНО РАЗВЕРНУТОЕ СОСТОЯНИЕ ЛИЗОЦИМА С РАЗВИТОЙ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ В ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДЕ

© 1996 г. А. А. Тимченко, М. Д. Киркитадзе[#], Д. А. Прохоров, С. А. Потехин, И. Н. Сердюк*

Институт белка РАН, 142292, Пушкино Московской обл.;

*Объединенный институт ядерных исследований, 141980, Дубна Московской обл.

Поступила в редакцию 14.12.95 г.

Конформация молекулы лизоцима куриного яйца (размеры, стехиометрия его ассоциатов, степень спиральности) в растворах диметилсульфоксида (DMSO) исследована методами малоуглового рассеяния нейтронов, динамического рассеяния света и дисперсии оптического вращения в видимой области. Показано, что при высоких концентрациях DMSO (70%) белок образует димер. Мономер в составе димера приобретает частично развернутую конформацию с размерами молекулы существенно большими, чем в нативном состоянии, и высоким уровнем вторичной структуры (степень спиральности близка к таковой для нативного лизоцима). Примененный подход дает уникальную возможность судить о компактности молекул в составе ассоциатов, что может быть крайне полезным в области белковой самоорганизации.

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

Созревание глобулярных белков в клетке обусловлено двумя основными процессами: биохимическим – синтезом аминокислотной последовательности, осуществляемым рибосомой с участием белоксинтезирующего аппарата клетки, и физическим – приобретением белковой молекулой функционально активной организации. Вопрос, каким образом белки сворачиваются в функционально активную пространственную структуру, является одним из основных в физике белка. Наличие определенной иерархии структурной организации белковой молекулы наводит на мысль, что существует определенная последовательность событий, определяющая путь ее самоорганизации. Экспериментальное исследование самоорганизации белка включает в себя два основных подхода: равновесный и кинетический. Равновесный подход сводится к тому, чтобы “выключать” часть внутримолекулярных взаимодействий, поддерживающих нативную структуру белка, и анализировать конформационное состояние, которое при этом реализуется. Такое “выключение” достигается постепенным изменением внешних условий (состава растворителя, температуры, pH среды и т.д.). Используя равновесный подход, исследователи довольно быстро обратили внимание на то, что на пути разворачивания (денатурации) белковых молекул часто накапливаются конформационные состояния, промежуточные между нативным и полностью развернутым. Такие промежуточные конформационные

состояния получили название частично свернутых. Так, было показано, что добавление низкомолекулярных спиртов способно индуцировать образование промежуточных состояний убиквитина [1], РНКазы [2–4] и ряда других белков [5]. Обнаружено, что для лизоцима в трифторэтаноле реализуется частично свернутое состояние [6], по свойствам аналогичное раннему интермедиату, наблюдаемому при изучении кинетики сворачивания лизоцима [7]. При этом содержание α -спиральной конформации в лизоциме растет [6]. Добавление в раствор DMSO также приводит к образованию высокоспиральной денатурированной формы лизоцима [8]. Возможно, это связано с ослаблением водородных связей в лизоциме при высоких концентрациях DMSO [9]. Вышесказанное наводит на мысль, что можно подобрать условия для лизоцима в DMSO, в которых были бы реализованы его частично свернутые формы, и оценить компактность и форму молекул в этих условиях.

Для решения этих вопросов были применены метод диффузного рассеяния нейтронов и метод лазерной корреляционной спектроскопии. Первый из них позволяет исследовать конформацию белка в растворе с различным разрешением, а также обнаруживать и характеризовать стабильные белковые комплексы. Использование для этих целей рентгеновских лучей оказалось неприменимым из-за их сильного поглощения DMSO. Второй метод дает возможность показать распределение частиц по размерам и обнаружить слабые

[#] Автор для переписки.

коллективные движения молекул, связанные с гидродинамическими взаимодействиями.

В предыдущей работе [8] был проведен анализ степени спиральности лизоцима методом дисперсии оптического вращения в зависимости от содержания DMSO в растворе при pH 2.5. Было обнаружено, что при концентрации DMSO больше 45% происходит денатурационный переход, сопровождающийся увеличением степени спиральности белка. Столь высокая степень спиральности денатурированного состояния в присутствии DMSO, вероятно, связана с уменьшением диэлектрической проницаемости среды и усилением дипольных взаимодействий пептидных связей с зарядами соседних боковых групп [10, 11]. Действительно, как было показано в работе [8], в 70% водном DMSO степень спиральности белка существенно зависит от значения pH среды. Кроме того, в 70% водном DMSO при pH 2.0 и достаточно высоких концентрациях белка (>1%) наблюдается еще один эффект, указывающий на наличие достаточно сильных межмолекулярных взаимодействий. Через определенное характерное время инкубации препарата (более 10 ч при pH 2.0) параметр Моффита-Янга b_0 [12] приобретает положительное значение, что не может быть интерпретировано в рамках их теории и, возможно, связано с появлением в растворе определенной структуры, возможно жидкокристаллического типа. Эффект может быть в значительной степени устранен прогреванием препарата (рис. 1) или повышением pH среды.

Выявление межмолекулярных взаимодействий лизоцима в растворах DMSO ставит вопрос количественного описания ассоциации молекул белка и получения структурной информации о реальной конформации белковой молекулы. Количественный анализ дисперсности растворов лизоцима в DMSO был проведен методом лазерной корреляционной спектроскопии. Этот подход позволяет получить распределение частиц по размерам, оценить средние размеры и получить информацию о молекулярной массе объекта. Вычисляемая нормированная корреляционная функция первого порядка $g^{(1)}(t)$ для смеси частиц представляется следующей суммой [13]:

$$g^{(1)}(t) = \sum_i a_i \exp(-D_i q^2 t),$$

где a_i – доля рассеянного излучения i -го компонента, обладающего коэффициентом поступательной диффузии D_i , q – модуль вектора рассеяния. Пример получаемой корреляционной функции приведен на рис. 2. Таким образом, имеется возможность раздельного получения гидродинамических размеров компонентов в смеси.

Кроме того, у частиц с размерами, много меньшими длины волны видимого света, молекуляр-

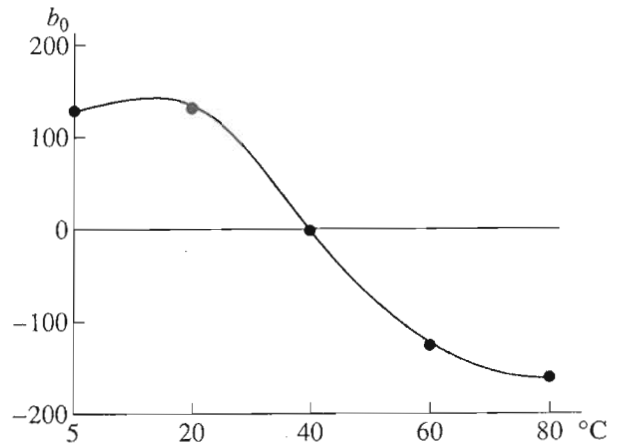


Рис. 1. Зависимость параметра Моффита-Янга (b_0) от температуры для лизоцима в 70% DMSO, pH 2.0.

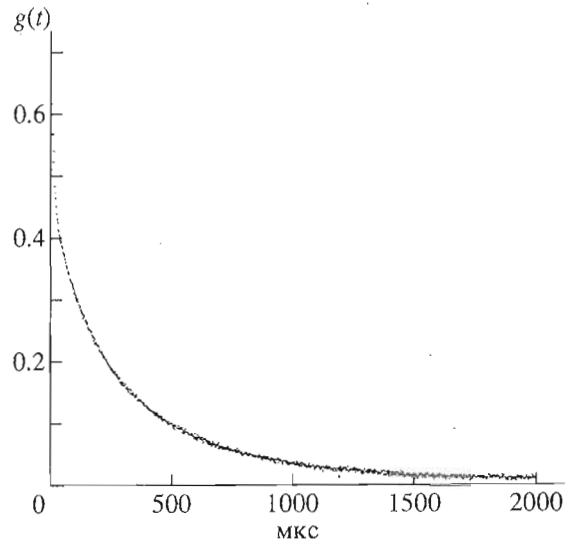


Рис. 2. Нормированная корреляционная функция первого порядка для раствора лизоцима в 70% DMSO при 20°C и pH 2.5.

ная масса может быть оценена из сравнения статической интенсивности рассеяния образца с тем же параметром для стандарта. В качестве стандарта был взят раствор нативного лизоцима при pH 2.5, содержащий 50 мМ KCl для ослабления электростатических взаимодействий макромолекул. Знание молекулярной массы и среднего коэффициента диффузии частиц позволяет оценить стехиометрию и конформацию образующихся ассоциатов.

Были исследованы растворы лизоцима в последенатурационной области при объемной концентрации DMSO 70% и pH 2.5. Поскольку при pH 2.5 молекулы лизоцима заряжена, растворы белка в DMSO приготавливали таким образом,

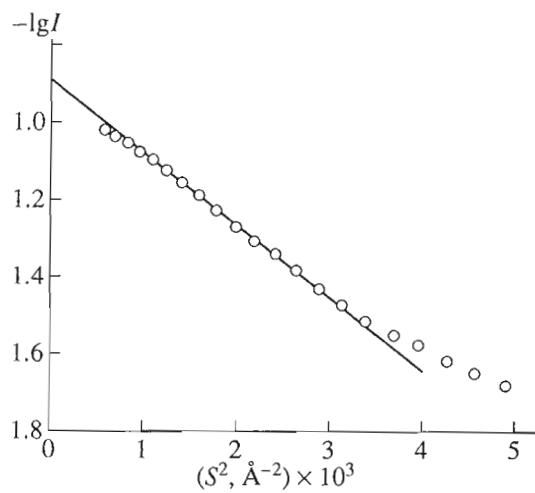


Рис. 3. Малоугловая часть рассеяния нейтронов для лизоцима в 70% DMSO, pH 2.5, построенная в координатах Гинье [15] (I – интенсивность рассеяния, S – модуль вектора рассеяния).

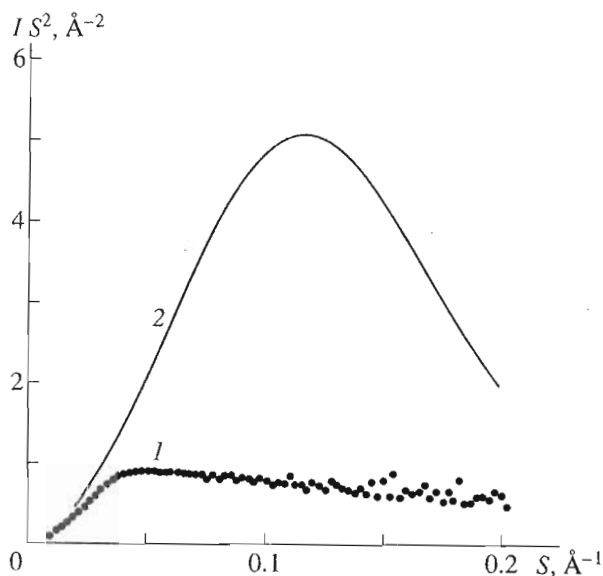


Рис. 4. Кривая рассеяния нейтронов для лизоцима в 70% DMSO, pH 2.5, построенная в координатах Кратки (1); 2 – индикатриса рассеяния кристаллической структуры лизоцима ($I \cdot S^2$ от S).

чтобы радиус Дебая–Хюккеля ($R \sim (\epsilon/\gamma)^{0.5}$)* был бы практически таким же, как в отсутствие DMSO, а также, чтобы концентрация белка во всех растворах была примерно постоянна.

Из интенсивности рассеяния под углом 90° была оценена молекулярная масса частиц, которая оказалась в 2.4 ± 0.3 раза выше, чем для нативного белка. Гидродинамический радиус частиц, вычисляемый из разложения корреляционной

* ϵ – относительная диэлектрическая проницаемость среды, γ – ионная сила раствора.

функции, оказался в 2.4 ± 0.1 раза выше, чем для нативного белка. Если предположить, что увеличение гидродинамических размеров обусловлено димеризацией глобулярных мономеров белка, то, аппроксимируя мономер шаром, на основе теории Кирквуда–Райзмана [14] легко вычислить, что гидродинамические размеры димера всего в 1.33 раза выше, чем у мономера. В случае же тримеров эта величина не превышает 1.7. Поэтому наблюдаемое более чем вдвое увеличение гидродинамических размеров частиц в 70% DMSO при pH 2.5 свидетельствует о неглобулярности молекулы лизоцима в этих условиях.

Об этом же свидетельствуют и данные диффузного рассеяния нейтронов для лизоцима в тех же условиях. Как известно [14], из малоугловой части кривой рассеяния можно получить сведения о средних размерах объекта и его молекулярной массе. На рис. 3 приведена малоугловая часть кривой рассеяния, построенная в координатах Гинье [15]. В таких координатах кривая рассеяния в начальной своей области представляет собой прямую линию, наклон которой составляет $-R_g^2/3$ (R_g – радиус инерции частицы), а из начальной ординаты можно вычислить молекулярную массу [15]. Оказалось, что средняя молекулярная масса в 2.3 ± 0.2 раза превосходит массу нативного белка, а значение R_g равно 35 ± 1 Å. В то же время значение R_g нативного лизоцима составляет 14.6 Å [16]. Известно [17], что размеры молекулы в состоянии “расплавленной” глобулы мало отличаются от таковых для нативного белка. Если принять, что молекула лизоцима в указанных условиях мало отличается от нативной и существует в виде димера (исходя из сведений о средней молекулярной массе), легко рассчитать, что R_g димера будет равен 23 Å, что существенно меньше наблюдаемой величины $R_g = 35$ Å. И только в случае линейного тримера величина R_g будет близка к наблюдаемой величине, составляя 33 Å. Но эта модель не проходит ни на основании данных по молекулярной массе, ни на основании определенных нами гидродинамических размеров (см. выше). Все это свидетельствует о том, что молекула лизоцима имеет развернутую конформацию и находится преимущественно в димерной форме.

Более детальные сведения о конформации частиц можно получить из кривой рассеяния нейтронов в широком диапазоне величин переданного импульса S . На рис. 4 приведена кривая рассеяния для лизоцима в 70% DMSO, построенная в координатах Кратки [15]. Характерная особенность этого графика – наличие обширного плато для $S > 0.04$ Å⁻¹ с небольшим спадом. Появление плато на кривой рассеяния в координатах Кратки свидетельствует о неупорядоченности структуры белка [15]. Для сравнения на этом же рисунке

изображена кривая рассеяния от кристаллической структуры лизоцима, рассчитанная методом кубиков [18]. Отрицательный наклон плато указывает на отличие конформации молекулы от идеального гауссова клубка.

Таким образом, совокупность полученных данных показывает, что при высоких концентрациях DMSO (70%) молекула лизоцима находится преимущественно в димерной форме. Мономер в составе димера приобретает частично развернутую конформацию с размерами существенно большими, чем у нативной молекулы, высоким уровнем вторичной структуры со степенью спиральности, близкой по величине для нативного белка. Возможно, что найденная конформация молекулы лизоцима в 70% DMSO близка к той, которая наблюдается на ранних этапах сворачивания белков [19], где данные КД обнаруживают высокий уровень вторичной структуры [20] при высокой подвижности такой конформации [21]. Следует подчеркнуть, что примененные здесь абсолютные методы дают уникальную возможность характеристики конформации молекул в составе ассоциатов, что открывает перспективу применения этих методов в области белковой самоорганизации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Лизоцим куриного яйца ("Реакхим", марка В) дополнительно дважды перекристаллизовывали. Чистоту препарата проверяли электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии ДСН при рН 8.3 [22]. Количество примесей не превышало 5%. В экспериментах использовали препарат DMSO фирмы Serva (ФРГ).

Концентрацию белка в 20 мМ глициновом буфере при рН 2.5 измеряли спектрофотометрически, используя величину оптического поглощения $A_{280}^{1\%} = 26.7$. Для нахождения концентрации лизоцима в DMSO проводили калибровочные измерения на одном и том же растворе лизоцима с добавлением в одном случае буфера, а в другом – того же объема DMSO. Концентрация белка во всех измерениях составляла 10–20 мг/мл.

Измерения ДОВ проводились на поляриметре Perkin–Elmer 141 в диапазоне длин волн 364–579 нм. Длина оптического пути в ячейке составляла 100 мм при объеме 1 мл. Результаты обрабатывали по уравнению Моффита–Янга [12], учитывая зависимость параметра b_0 от показателя преломления среды.

Измерения динамического рассеяния света (ДРС) проводили на спектрометре, подробно описанном в работе [23], при температуре $20 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Мощность лазера составляла 100–200 мкВт. Для расширения диапазона времен корреляции использовался также коррелятор времен прибытия

на основе компьютера РС-АТ-386, созданный в нашей группе Г.А. Ениним.

Рассеяние света измерялось в основном под углом 90° . Относительная экспериментальная ошибка измерения составляла 0.1–0.3%. Управление коррелятором осуществляли с помощью компьютера. Обработку данных производили с помощью программы "Некорректность", созданной в лаборатории физики нуклеопротеидов Института белка РАН [13]. Программа позволяет идентифицировать компоненты в растворе и получать их коэффициенты диффузии. Гидродинамические размеры вычисляли из коэффициентов диффузии согласно соотношению Эйнштейна–Стокса [15]:

$$D = kT/6\pi\eta R,$$

где k – константа Больцмана, T – температура в кельвинах, η – динамическая вязкость растворителя, R – стоксов радиус молекулы.

Измерения кривых рассеяния нейтронов проводили на установке ЮМО (ОИЯИ, Дубна), подробно описанной в работе [24]. Время эксперимента составляло 12 ч. Рассеяние измеряли в диапазоне величин переданного импульса $S = 0.01 - 0.2 \text{ \AA}$.

Авторы выражают благодарность Г.А. Енину за предоставление в наше распоряжение коррелятора времен прихода, а также М.В. Авдееву за помощь в экспериментах по рассеянию нейтронов.

Данная работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (№ 94-04-11787-а и 95-11846-а) и грантом Международного научного фонда и правительства Российской Федерации № MVE300.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pan Y., Briggs M.S. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 11405–11412.
2. Lustig B., Fink A.L. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1992. V. 1121. P. 229–233.
3. Biringer R.G., Fink A.L. // *J. Mol. Biol.* 1982. V. 160. P. 87–116.
4. Fink A.L., Painter B. // *Biochemistry*. 1987. V. 26. P. 1665–1671.
5. Ptysin 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.
6. Buck M., Radford S.E., Dobson C.M. // *Biochemistry*. 1993. V. 32. P. 669–678.
7. Dobson C.M., Evans P.A., Radford S.E. // *Trends Int. Biochem. Sci.* 1994. V. 19. P. 31–37.
8. Куркутадзе М.Д., Сурин А.С., Потехин С.А. // *Биоорганическая химия*. 1996. Т. 22. С. 21–24.
9. Porubcan R.S., Watters K.L., McFarland J.T. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1978. V. 186. P. 255–264.

10. Nelson J.W., Kallenbach N.R. // *Proteins*. 1986. V. 1. P. 211–217.
11. Yang J.J., Pitkeathly M., Radford S.E. // *Biochemistry*. 1994. V. 33. P. 7345–7353.
12. Yang J.T. // *Poly-amino-acids* / Ed. G.D. Fasman. N.Y., 1967. P. 239–288.
13. Danovich R.D., Serdyuk I.N. // *Proton Correlation Techniques in Fluid Mechanics*. V. 38 / Ed. E.O. Shulz-DeBois. Berlin, 1983. P. 315.
14. Кантор Ч., Шиммелл П. // *Биофизическая химия: Пер. с англ.* М.: Мир, 1984. Т. 2. Гл. 10. С. 178–222.
15. Kratky O. // *Small Angle X-ray Scattering* / Eds O. Glatter, O. Kratky. L.: Acad. Press, 1982. P. 361.
16. Тимченко А.А., Птицын О.Б., Сердюк И.Н., Федоров В.А., Кравченко Н.А. // *Докл. АН СССР*. 1983. Т. 230. С. 458–461.
17. Timchenko A.A., Dolgikh D.A., Damaschun U., Damaschun G. // *Studia Biophys.* 1986. V. 112. P. 201–206.
18. Pavlov M.Yu., Fedorov B.A. // *Biopolymers*. 1983. V. 22. P. 1507–1522.
19. Radford S.E., Dobson C.M., Evans P.A. // *Nature*. 1992. V. 358. P. 302–307.
20. Broadhurst R.W., Dobson C.M., Hore P.J., Radford S.E., Rees M.L. // *Biochemistry*. 1991. V. 30. P. 405–412.
21. Miranker A., Robinson C.V., Radford S.E., Aplin R.T., Dobson C.M. // *Science*. 1993. V. 262. P. 896–899.
22. Maizel J.V. // *Methods Virol.* 1971. V. 227. P. 680–685.
23. Тимченко А.А., Грико Н.Б., Сердюк И.Н. // *Оптика и спектроскопия*. 1988. Т. 64. С. 343–349.
24. Serdjuk I.N. // *Physica B*. 1995. V. 213. P. 892–894.

A Partially Unfolded State of Lysozyme with Developed Secondary Structure in Dimethylsulfoxide

A. A. Timchenko*, M. D. Kirkitadze*,¹ D. A. Prokhorov*, S. A. Potekhin*, and I. N. Serdyuk**

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

** *Joint Institute for Nuclear Research, alya 79, Dubna, Moscow oblast, 141980 Russia*

Abstract—The conformation of a chicken egg lysozyme molecule (dimensions, stoichiometry of its associates, and the degree of helicity) in DMSO was studied by small-angle neutron scattering, dynamic light scattering, and optical rotatory dispersion in the visible region of the spectrum. At high DMSO concentrations (70%), the protein was shown to exist as a dimer. The monomer molecules in the dimer adopt a partially unfolded conformation, with dimensions substantially greater than those in the native state and a high content of secondary structure (the degree of helicity is close to that of native lysozyme). This approach provides a unique possibility to assess the compactness of molecules in associates, which may be very useful in studying protein self-organization.

Key words: lysozyme, denatured state, secondary structure, dimethylsulfoxide.

¹ To whom correspondence should be addressed.