

УДК 577.150.3

Исследование интермедиатов разворачивания глобулярных белков методом тритиевой метки

А. В. Волынская, Э. А. Касумов, А. В. Шишков

АЛЕФТИНА ВАСИЛЬЕВНА ВОЛЫНСКАЯ — кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник Института химической физики им. Н. Н. Семенова РАН (ИХФ РАН). Область научных интересов: конформационные переходы белков, проблемы фолдинга.

ЭЛЬДАР АЛИШ-ОГЛЫ КАСУМОВ — аспирант ИХФ РАН. Область научных интересов: конформационные переходы белков, проблемы фолдинга.

АЛЕКСАНДР ВЛАДИМИРОВИЧ ШИШКОВ — доктор химических наук, профессор, заместитель директора ИХФ РАН. Область научных интересов: применение метода тритиевой метки к исследованию структуры биологических объектов, моделирование пространственной структуры белков.

119991 Москва, ул. Косыгина, 4, ИХФ РАН, тел. (495)939-72-62, E-mail avolynskaya@mail.ru

Введение

Хорошо известно, что полипептидная цепь в ходе биосинтеза сворачивается, образуя уникальную пространственную структуру, обладающую строго определенными функциональными свойствами. Но до настоящего времени остается непонятным, по какому механизму аминокислотная последовательность белковой молекулы (первичная структура) определяет ее трехмерную (третичную) структуру. Одна из гипотез относительно механизма самоорганизации белковых молекул постулирует, что процесс сворачивания проходит через ряд интермедиатов с последовательным возрастанием степени упорядоченности структуры [1–3]. Существование одного из интермедиатов — расплавленной глобулы — экспериментально доказано и охарактеризовано для большого числа белков [3]. Тем не менее вопрос о роли расплавленной глобулы как универсального интермедиата на пути сворачивания и разворачивания полипептидной цепи остается дискуссионным и до сих пор не получил однозначного ответа [4–6]. Прежде всего это относится к небольшим молекулам белка (порядка 100 аминокислотных остатков), сворачивание которых, как правило, осуществляется как переход между двумя состояниями [7–10]. Анализ кинетики процесса сворачивания однодоменных белков дает основание предположить, что сворачивание может протекать по разным механизмам: либо путем перехода между двумя состояниями без образования интермедиатов, либо через стадию расплавленной глобулы [11].

Типичным небольшим белком (124 остатка) является панкреатическая рибонуклеаза А. Имеющиеся сведения о механизме сворачивания—разворачивания этого белка противоречат представлениям о едином механизме их сворачивания. Согласно результатам исследования калориметрическим, хроматографическим и оптическими методами, равновесное разворачивание молекулы рибонуклеазы А происходит в одну стадию без образования интермедиатов [12–15], а результаты ЯМР исследования показали, что разворачивание глобулы этого белка в растворах мочевины и

гуанидинхлорида (денатурирующие агенты) не является переходом между двумя состояниями [16]. Более того, при исследовании кинетики данного процесса в растворах гуанидинхлорида был обнаружен интермедиат типа «сухая» расплавленная глобула [17]. Однако обнаружить присутствие расплавленной глобулы при разворачивании в равновесных условиях до сих пор не удавалось.

В представленной работе мы исследовали процесс разворачивания глобулы рибонуклеазы А в растворах денатурирующих агентов в условиях равновесия с помощью метода тритиевой метки. Ранее мы показали, что этот метод может быть применен для количественной оценки площади доступной растворителю поверхности глобулярных белков [18]. Изменение этой площади в растворах денатурирующих веществ может служить в качестве параметра, характеризующего структурные переходы в глобуле белка.

Как инструмент исследования метод тритиевой метки имеет то важное достоинство, что не приводит к изменениям в пространственной структуре биологических объектов [18–22]. Кроме того, доступная поверхность может быть определена не только для глобулы в целом, но и для отдельных составляющих ее аминокислотных остатков. Это позволяет обнаружить небольшие изменения пространственной структуры белка [23] и получить новую детальную информацию о процессе разворачивания глобулы [24].

Основы метода тритиевой метки

Метод тритиевой метки, разработанный в Институте химической физики РАН, основан на способности «горячих» атомов трития с энергией $\geq 0,3$ эВ замещать атомы водорода в углеводородных фрагментах (CH , CH_2 , CH_3) аминокислотных остатков [19–21]. Замещение водорода происходит только при первом столкновении атома трития с мишенью (молекулой белка), при этом стабильная радиоактивная метка внедряется в поверхность белковой молекулы, доступная при прямом пролете атомов трития. Глубина проникновения атомов трития в глобулу не превышает 5 Å, так

что метка оказывается включенной только в ее поверхностный слой. Тритиевую метку вводят в замороженные (77 К) тонкие пленки 1%-ного раствора белка («горячие» атомы трития генерируются при термической диссоциации молекулярного трития на вольфрамовой нити, нагретой до 2000 К). Радиоактивно меченный (C^3H , C^3H_2 , C^3H_3) и очищенный от лабильного трития (N^3H , N^3H_2 , S^3H , O^3H , COO^3H) белок гидролизуют до свободных аминокислот по стандартной методике, анализируют на аминокислотном анализаторе и определяют радиоактивность каждой фракции [24].

Для нативных меченых глобул между удельной радиоактивностью I_i и площадью доступной растворителю поверхности аминокислотного остатка $s_{N,i}$ существует пропорциональная связь:

$$I_i = k \cdot s_{N,i}$$

где k — коэффициент пропорциональности, равный $0,1 \pm 0,025$ для всех типов аминокислотных остатков [18].

Для ненативных условий связь между рассматриваемыми величинами описывается выражением [24]:

$$s_{D,i} = s_{N,i} + \Delta I_i / (k \cdot n_i)$$

где $s_{N,i}$ и $s_{D,i}$ — площадь доступной поверхности, приходящаяся на остатки в нативном и ненативном состоянии белка, соответственно; ΔI_i — разность соответствующих удельных радиоактивностей; n_i — число остатков данного типа в глобуле.

Суммирование величин s_i по всем типам остатков и их количеству дает площадь доступной поверхности всей глобулы S . Отметим, что в представленной ниже работе приводятся средние значения доступных площадей для данного типа аминокислотных остатков и относятся только к их углеводородным фрагментам. Для получения полной доступной поверхности глобулы S_{tot} величину S следует умножить на коэффициент, связывающий доступную поверхность СН-групп с полной поверхностью остатка (среднее значение этого коэффициента 2,5) [18].

Для оценки конформационных изменений при переходе белка в ненативное состояние большую информацию дают не абсолютные значения доступных площадей аминокислотных остатков (которые опреде-

ляются не только доступностью, но и размером остатка), а доля экспонированной f_e или спрятанной f_{sh} поверхности:

$$f_e = s_N / s_{AXA}; f_{sh} = 1 - f_e$$

где s_N и s_{AXA} — доступные площади остатков в нативном и полностью развернутом состояниях. Развернутое состояние аппроксимируется модельными трипептидами Ala-X-Ala, где X — любой из остатков аминокислотной последовательности [25].

Структурные особенности и свойства интермедиатов разворачивания глобулярных белков

Ниже обсуждаются результаты серии экспериментов, проведенных с использованием метода тритиевой метки, по изучению состояния глобулярных белков (на примере фермента рибонуклеазы А) в растворах денатурирующих веществ — мочевины и гуанидинхлорида.

Степень компактности интермедиатов

Для обнаружения интермедиатов, образующихся при разворачивании глобулы белка, и оценки их структурных особенностей получали экспериментальные зависимости площади доступной растворителю поверхности глобулы от концентрации денатурирующих веществ в растворе (кривые разворачивания) и на основании их анализа делали заключение о числе структурных переходов белка в растворе и степени компактности интермедиатов. По экспериментальным данным рассчитывали площадь доступной поверхности СН-групп глобулы рибонуклеазы, площади ее полной и гладкой поверхности, радиус и объем глобулы, а также площади поверхности гидрофобного ядра и ядра глобулы в нативном и промежуточном состояниях (см. таблицу).

Рис. 1 показывает изменение площади доступной поверхности глобулы рибонуклеазы А, а также изменение активности фермента в зависимости от концентрации мочевины (ферментативная активность денатурированной рибонуклеазы будет рассмотрена в следующем разделе). Площадь доступной поверхности глобулы получена суммированием площадей всех аминокислотных остатков, составляющих глобулу.

Таблица

Геометрические параметры глобулы рибонуклеазы А в нативном и денатурированном состояниях

Параметр	Состояние глобулы			
	нативное N	промежуточное в мочеvine	полностью развернутое AXA в GuCl*	
Площадь доступной поверхности, Å ²	2900	5600	3700	7400
Полная доступная поверхность, Å ²	7250	14000	9250	18500
Коэффициент шероховатости	2,0	2,73	2,1	
Площадь гладкой поверхности, Å ²	3600	5100	4400	
Радиус, Å	17,0	20,1	18,7	
Объем, Å ³	20550	34000	27400	
Полная доступная поверхность, Å ²				
гидрофобного ядра	240	740	530	2130
ядра глобулы	530	1550	870	3120

* Гуанидинхлорид.

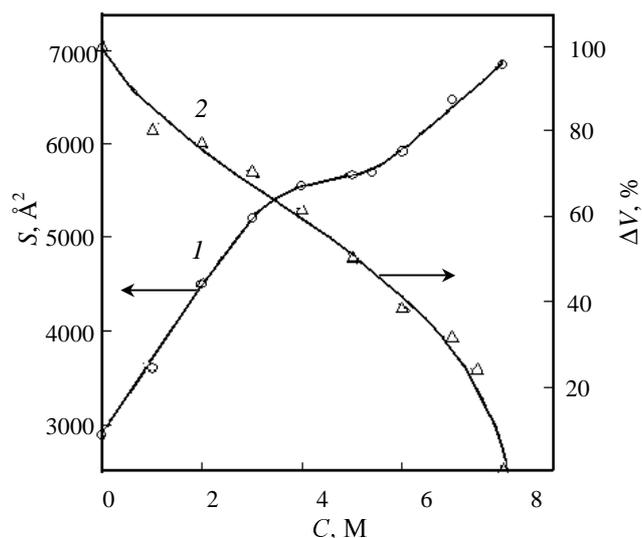


Рис. 1. Зависимость площади доступной поверхности (1) и изменения ферментативной активности (2) рибонуклеазы А от концентрации мочевины

Бифазный характер кривой разворачивания глобулы рибонуклеазы (кривая 1) соответствует модели трех, а не двух состояний [14, 27]. Это означает, что процесс разворачивания нативной глобулы N в развернутое состояние U протекает через стадию образования промежуточного состояния I (интермедиата): $N \rightarrow I \rightarrow U$ [1]. Экспериментальные данные, представленные в нормализованных координатах $f_d - C$, где f_d — доля денатурированных молекул, равная $(s_c - s_N)/(s_d - s_N)$, s_c — доступная поверхность глобулы при данной концентрации денатурирующего вещества, s_N и s_d — соответствующие величины для нативного и денатурированного состояний белка (рис. 2), показывают оба перехода $N \rightarrow I$ и $I \rightarrow U$. По этим кривым мы определили концентрацию максимальной популяции интермедиата, которая составила 4,5 моль/л мочевины.

Большая чем у нативной глобулы площадь доступной поверхности интермедиата указывает на разрушение глобулы и увеличение ее объема. Зная полную (СН и все остальные атомы аминокислотных остатков) площадь поверхности глобулы в промежуточном состоянии, в принципе можно оценить объем интермедиата. Однако вычислить объем непосредственно из площади доступной поверхности нельзя, поскольку она больше соответствующей гладкой поверхности эквивалентной сферы. Известно, что для многих белков в нативном состоянии отношение доступной поверхности S_N к гладкой A_N (коэффициент шероховатости p_N) равно 2 при сферической форме глобулы [28]. Источником разницы в этих величинах является главным образом атомный уровень шероховатости молекулярной поверхности глобулы. Неровности большего масштаба (впадины и выступы на поверхности глобулы в основном в области активного центра) также вносят вклад в коэффициент шероховатости, но существенно меньший, чем атомная шероховатость. Расширение глобулы при переходе в промежуточное состояние должно привести к возрастанию коэффициента шероховатости из-за увеличения изрезанно-

сти рельефа ее поверхности в результате того, что сегменты полипептидной цепи раздвигаются (появляются новые впадины и выступы). Очевидно, что увеличение коэффициента шероховатости $\Delta p = p_I - p_N$ прямо связано с изменением доступной поверхности интермедиата по сравнению с нативным состоянием ($S_I - S_N$). Предположим, что эта связь выражается так:

$$\Delta p = p_N \cdot (S_I - S_N) / S_{AXA}$$

где S_{AXA} — доступная поверхность полностью развернутой полипептидной цепи.

Нормирование разности поверхностей на S_{AXA} необходимо, чтобы учесть тот факт, что увеличение доступной поверхности при разворачивании имеет предел, равный доступной поверхности полностью развернутой полипептидной цепи. Подставив в это выражение значения величин S_N , S_I , S_{AXA} (см. таблицу) и $p_N = 2$, получаем $p_I = 2,73$. С помощью найденного коэффициента p_I были вычислены площадь гладкой поверхности интермедиата, а также его радиус и объем (см. таблицу). Из данных таблицы следует, что интермедиат имеет промежуточную между нативным и развернутым состояниями степень компактности. Увеличение радиуса и объема молекулы интермедиата, образующегося в растворе мочевины, относительно параметров нативного белка составляет 18 и 65%, соответственно, что характерно для типичных расплавленных глобул [3, 29].

На рис. 3 и 4 представлены кривые разворачивания глобулы рибонуклеазы в растворах гуанидинхлорида и хлорида лития. Известно, что обе соли оказывают денатурирующее действие на белки, однако механизм их взаимодействия с белком может отличаться от механизма влияния нейтральных молекул мочевины.

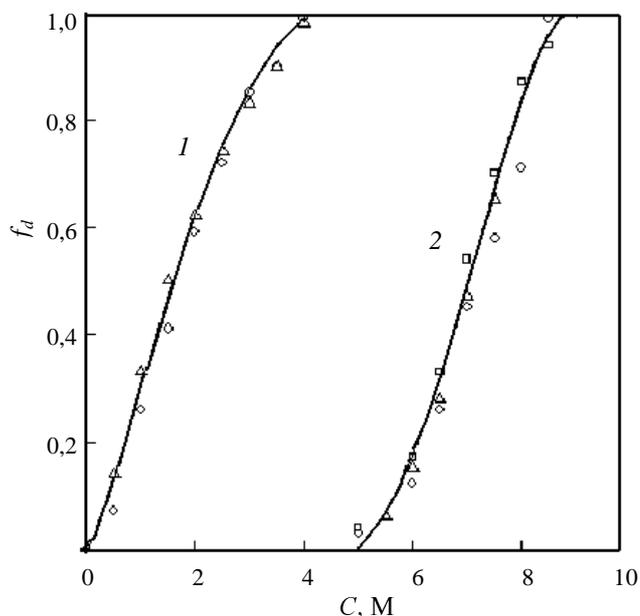


Рис. 2. Зависимость доли денатурированных молекул рибонуклеазы А от концентрации мочевины:

1 — переход $N \rightarrow I$; 2 — переход $I \rightarrow U$. Для расчета доли денатурированных молекул использованы три измеренные величины: \circ — доступная поверхность, Δ — ферментативная активность, \square — оптическое вращение $[-\alpha]_{365}$

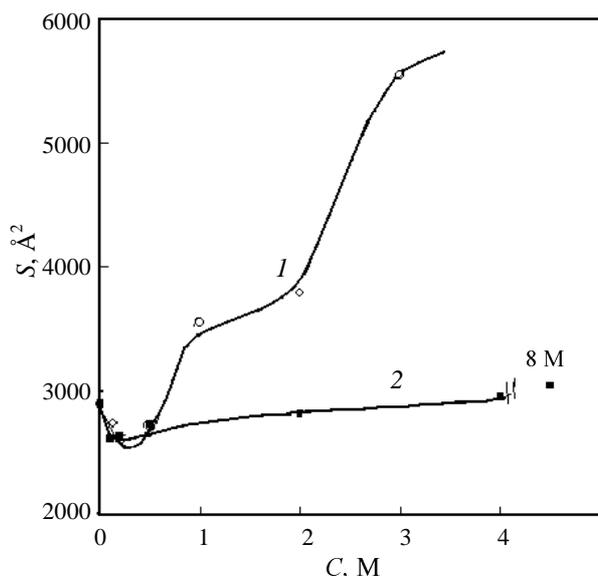


Рис. 3. Зависимость площади доступной поверхности рибонуклеазы А от концентрации гуанидинхлорида (1) и хлорида лития (2) в области высоких концентраций солей

Как видно из рис. 3, кривая изменения площади доступной поверхности в растворах гуанидинхлорида похожа на аналогичную зависимость для растворов мочевины, за исключением хода кривой в области концентраций 0–0,3 М, где доступная поверхность уменьшается, что можно трактовать как сжатие глобулы. Кривые разворачивания глобулы в растворах хлорида лития и гуанидинхлорида имеют то сходство, что обе они проходят через минимум в области низких концентраций соли. Однако при высоких концентрациях LiCl данные метода тритиевой метки не указывают на разворачивание глобулы — в области концентраций LiCl вплоть до 3 М доступная поверхность белка меньше, а в 8 М растворе лишь незначительно больше, чем в нативном состоянии. Это хорошо согласуется с известными данными о слабом денатурирующем действии LiCl на рибонуклеазу А и о повышении ее стабильности при высоких концентрациях соли (вплоть до 3 М) [30].

Вид кривой разворачивания глобулы рибонуклеазы в растворах гуанидинхлорида (см. рис. 3) после сжатия так же, как и в случае мочевины, соответствует модели трех состояний. Нормализованные кривые переходов показаны на рис. 5. Концентрация максимальной популяции интермедиата в этом случае равна 1,8 моль/л гуанидинхлорида. Оценки изменения размера глобулы, проведенные по той же схеме, что и в случае мочевины, показывают, что радиус и объем увеличиваются на 10 и 33%, соответственно (см. таблицу). Таким образом, по степени компактности интермедиат в растворе гуанидинхлорида также можно отнести к расплавленной глобуле [29].

Итак, присутствие интермедиатов обнаруживается по бифазному характеру зависимости площади доступной поверхности от концентрации денатурирующего вещества. Совсем другой вид имеют кривые разворачивания, фиксируемые по изменению оптического вращения $[-\alpha]_{365}$ [13]. В этом случае для обоих дена-

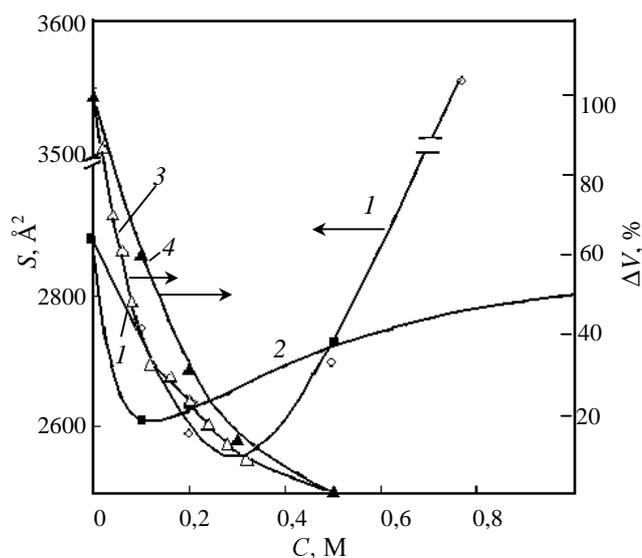


Рис. 4. Зависимость площади доступной поверхности (1, 2) и ферментативной активности (3, 4) рибонуклеазы А от концентрации гуанидинхлорида и хлорида лития в области низких концентраций солей:

○, △ — гуанидинхлорид; ■, ▲ — хлорид лития

турирующих агентов денатурация глобулы, обнаруживаемая по разрушению вторичных структур в белке, описывается монофазной зависимостью, характерной для перехода между двумя состояниями. При этом, разрушение вторичных структур и переход из промежуточного в развернутое состояние, фиксируемый по изменению площади доступной поверхности, происходят в одном и том же концентрационном интервале. Более того, как видно из рис. 2 и 5, нормализованные кривые перехода I → U, вычисленные по величинам изменения площади доступной поверхности и оптичес-

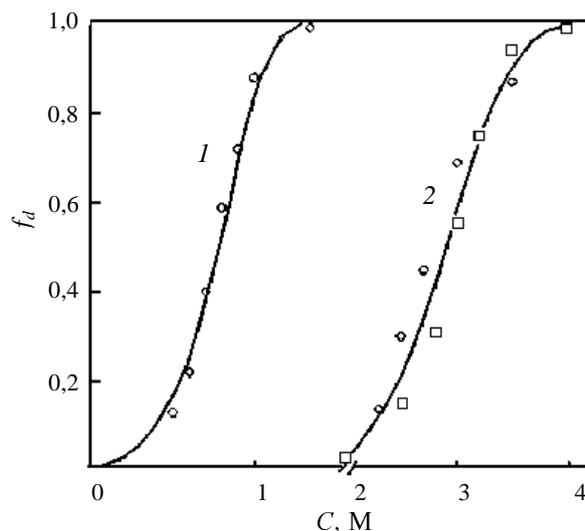


Рис. 5. Зависимость доли денатурированных молекул рибонуклеазы А от концентрации гуанидинхлорида:

1 — переход N→I; 2 — переход I→U. Для расчета доли денатурированных молекул использованы две измеренные величины: ○ — доступная поверхность, □ — оптическое вращение $[-\alpha]_{365}$

ского вращения, совпадают. Это означает, что разрушение вторичных структур в обоих денатурирующих растворах начинается только в переходе I → U. Следовательно, нативные вторичные структуры могут частично или полностью сохраняться в интермедиатах, что также характерно для расплавленных глобул [3].

Анализируя результаты исследований методом тритиевой метки на уровне отдельных видов аминокислотных остатков, мы обнаружили еще одну особенность структуры интермедиатов, присущую расплавленным глобулам. Доступная поверхность гидрофобных остатков Val, Leu, Ile и Phe в обоих интермедиатах — в растворе мочевины и в растворе гуанидинхлорида — больше, чем в нативном состоянии, что характерно для расплавленных глобул. С другой стороны, эти остатки имеют наименьшие величины доступных площадей и, следовательно, наиболее спрятаны в нативной глобуле, что позволяет отнести их к гидрофобному ядру. Как видно из таблицы, большая часть нативного гидрофобного ядра (74% в мочедине и 85% в гуанидинхлориде) сохраняется в интермедиатах, как и в типичных расплавленных глобулах [3, 31].

Что касается полярных остатков, то их доступные площади существенно больше доступных площадей гидрофобных остатков. Исключение составляют His и Tyr, которые в нативном белке спрятаны почти так же, как остатки гидрофобного ядра. В то же время неполярные Pro и Ala доступны так же, как и полярные. Поэтому логично выделить внутреннюю (гидрофобное ядро плюс His и Tyr) и внешнюю (все остальные остатки) области глобулы, обозначив первую ядром, а вторую — оболочкой. При таком рассмотрении находим, что 60% поверхности нативного ядра мочевинового интермедиата остаются недоступными растворителю и 85% — в гуанидинхлоридном интермедиате (см. таблицу).

Ферментативная активность интермедиатов

Ферментативную активность рибонуклеазы (субстрат — циклический цитидин-2',3'-монофосфат) определяли по методу Крука [26]. Концентрации субстрата и белка 100 и 35 мкг/мл, соответственно. За начальную скорость ферментативной реакции (V_0) принимали скорость изменения оптической плотности раствора в первую минуту после введения субстрата. Скорость реакции в чистой воде (нативном состоянии) принимали за 100%.

Ферментативная активность рибонуклеазы в растворах мочевины и обеих солей — гуанидинхлориде и LiCl — изменяется по-разному (см. рис. 1 и 4). В мочедине она уменьшается с увеличением доступной поверхности глобулы и для интермедиата составляет ~50% от активности нативного белка. В растворах солей активность снижается с уменьшением доступной поверхности, полностью ингибируется в 0,5 М растворе соли и не восстанавливается при расширении глобулы после ее сжатия. Вид зависимостей ферментативной активности от концентрации субстрата во всех случаях указывает на неконкурентный характер ингибирования [24].

Ход кривой изменения ферментативной активности рибонуклеазы в растворах мочевины (см. рис. 1, кривая 2) хорошо объясняется двухстадийным характером процесса разворачивания глобулы рибонуклеазы. Действительно, как видно из рис. 2, изменение

доли денатурированных глобул, вычисленное по данным измерения площади доступной поверхности и ферментативной активности, описывается одной и той же кривой для каждого из двух переходов. Из этого следует, что ферментативная активность рибонуклеазы в растворе мочевины зависит только от соотношения количеств глобул, находящихся в каждом из трех состояний (нативном, промежуточном и развернутом). Наличие ферментативной активности мочевинового интермедиата (хотя и уменьшенной) указывает на частичное сохранение нативоподобной укладки полипептидной цепи, что является принципиально важной особенностью расплавленных глобул [3]. Двукратное снижение активности в промежуточном состоянии, по-видимому, связано с увеличением объема и разрыхлением глобулы, поскольку никаких других структурных изменений глобулы в растворах мочевины в области концентраций вплоть до 5 М не было обнаружено. Как было показано выше, в разрыхленной глобуле достаточно большая часть ядра интермедиата остается недоступной растворителю. Поскольку расстояния между аминокислотными остатками в мочевиновом интермедиате увеличиваются в среднем приблизительно на 1 Å, что меньше диаметра молекулы воды (2,8 Å), то можно предположить, что область активного центра также остается частично недоступной молекулам воды. Это подтверждается данными работы [16], в которой методом ЯМР показано, что «нативный» пик одного из каталитических остатков — His 12 — исчезает при концентрации мочевины 6 М, а второго остатка — His 119 — при концентрации 7,9 М, т.е. при концентрациях, значительно более высоких, чем концентрация максимальной популяции интермедиата в мочедине.

В отличие от мочевинового интермедиата, интермедиат, образуемый в растворе гуанидинхлорида, не обладает ферментативной активностью. Как видно из рис. 4, снижение ферментативной активности происходит одновременно с уменьшением доступной поверхности глобулы. Между тем активность продолжает снижаться при расширении глобулы и не восстанавливается при достижении ее объема, соответствующего нативному белку. Данные метода тритиевой метки, а именно, более высокая степень компактности и меньшая доступность остатков в гуанидинхлоридном интермедиате по сравнению с интермедиатом в мочедине, предполагают меньшие изменения структуры и большую нативоподобность конформации интермедиата. Это предположение подтверждается данными работы [17], согласно которым спектр кругового дихроизма белка в ближней УФ-области, определяемый доступностью остатков Tyr в воде, и защищенность водородов в полипептидной цепи в отношении обмена в кинетическом интермедиате не отличаются от таковых для нативного состояния белка. О сохранении нативоподобной топологии в интермедиате разворачивания свидетельствуют и результаты экспериментов по повторному сворачиванию глобулы рибонуклеазы, денатурированной гуанидинхлоридом.

Особенности свойств ренатурированного белка

Эксперимент по ренатурации рибонуклеазы проводили следующим образом. После 30-минутной денатурации нативной рибонуклеазы в 3 М растворе гуанидинхлорида (время полной денатурации 20 мин [17])

денатурант удаляли двумя способами: двукратной гель-фильтрацией и диализом. Продолжительность ренатурации рибонуклеазы с неразорванными S—S-связями составляет менее 10 с [32]. Отделенный от денатуранта белок лиофилизovali, вводили тритиевую метку и определяли его ферментативную активность.

Как нами показано экспериментально, величины площадей доступных поверхностей аминокислотных остатков в повторно свернутом белке (одинаковые в пределах погрешности эксперимента при двух способах удаления гуанидинхлорида) совпадают с аналогичными величинами для интермедиата разворачивания. Это означает, что в процессе ренатурации молекула белка переходит не в нативное, а в промежуточное состояние, так что повторно свернутый белок можно рассматривать как интермедиат сворачивания.

Измерение ферментативной активности ренатурированного белка показало, что она не отличается от активности нативного белка. Из этого следует, что укладка полипептидной цепи в интермедиате сворачивания такая же, как в нативном белке. Поскольку доступные поверхности аминокислотных остатков в интермедиатах сворачивания и разворачивания практически одинаковы, то очевидно, что и структуры их также одинаковы. Из этого можно заключить, что интермедиат разворачивания может обладать ферментативной активностью и иметь нативоподобную укладку полипептидной цепи. Если это так, то понятно, что отсутствие ферментативной активности у интермедиата, образующегося в растворе гуанидинхлорида, не является следствием разрушения нативоподобной укладки полипептидной цепи. Ингибирование активности может быть вызвано высокой концентрацией соли, которая препятствует взаимодействию белка с заряженным субстратом. Подобные эффекты солей известны давно [33] и по крайней мере для заряженных субстратов объясняются не конформационными изменениями, а изменениями в заряженном состоянии как глобулы, так и субстрата. В частности, при достаточно высоких концентрациях солей двойной электрический слой, образующийся вокруг глобулы, может препятствовать взаимодействию заряженного субстрата с ферментом.

Надо сказать, что обнаруженная нами неполная обратимость денатурации рибонуклеазы в растворе гуанидинхлорида противоречит результатам других исследователей [32, 34, 35]. Многочисленные исследования обратимости денатурации показали, что для рибонуклеазы, как и для многих других белков, она обратима. Следует отметить, однако, что обычно используемые при исследовании ренатурации белков методы (седиментация, флуоресцентные и оптические), как правило, не обнаруживают присутствия интермедиатов и поэтому не могут однозначно свидетельствовать о полном восстановлении нативной структуры. Поскольку использованные в нашей работе два разных способа удаления денатуранта приводят к одному и тому же результату, то наблюдаемый эффект неполной обратимости денатурации, по всей вероятности, не является следствием экспериментальных манипуляций.

Результаты нашего исследования показывают, что неполная обратимость денатурации рибонуклеазы в

растворе гуанидинхлорида связана с необратимостью перехода нативной глобулы в промежуточное состояние. Похожий эффект был обнаружен в работе [36] при исследовании ренатурации высокомолекулярных белков — родоназы и эластазы, у которых полностью восстанавливаются оптические и спектральные свойства, но не восстанавливаются ферментативная и иммунная активности, что объясняют агрегацией глобул, находящихся в промежуточном состоянии с большой экспонированностью гидрофобной поверхности.

Гидратация интермедиатов

Увеличение доступной растворителю поверхности интермедиатов указывает на то, что расплавленная глобула более гидратирована, чем нативная. При этом, поскольку доступная поверхность аминокислотных остатков внутренней части глобулы (ядра) в обоих денатурантах (в растворе мочевины и в растворе гуанидинхлорида) также увеличивается, молекулы воды могут проникать и во внутренние районы расплавленной глобулы. Это означает, что оба интермедиата являются «влажными» расплавленными глобулами. Впервые предположение о невозможности существования «сухих» расплавленных глобул для водорастворимых глобулярных белков было высказано в теоретической работе Финкельштейна и Шахновича [37], однако экспериментальных доказательств этого пока еще мало [38, 39]. О проникновении молекул воды внутрь расплавленной глобулы свидетельствуют результаты компьютерного моделирования процесса разворачивания низкомолекулярных белков — барназы и химотрипсिनного ингибитора [40]. В случае барназы [41] компьютерный эксперимент прямо показывает, что на одной из стадий разворачивания увеличение доступной поверхности вследствие раздвигания α -спирали и β -складки происходит почти одновременно с проникновением молекул воды во внутренние районы глобулы. Существование нативоподобного интермедиата с гидратированным гидрофобным ядром было обнаружено при моделировании сворачивания SH₃-домена [42].

Результаты измерения доступной поверхности интермедиатов в мочеvine и гуанидинхлориде мы использовали для приближенной оценки величин их гидратации. Анализ имеющейся информации о числе гидратации [43] и доступной поверхности [18] белков в нативном состоянии показал, что между этими параметрами существует пропорциональная связь (коэффициент пропорциональности равен $0,06 \pm 0,02$). Для рибонуклеазы этот коэффициент равен 0,076 молекул воды на 1 Å² поверхности. Используя эту величину и данные таблицы, мы получили, что для интермедиата в мочеvine число гидратации составляет 1060 молекул воды на глобулу, а в гуанидинхлориде — 700. Эти величины можно оценить также по приросту объема глобулы при переходе в промежуточное состояние. Если весь дополнительный объем заполняется молекулами воды ($V = 30 \text{ \AA}^3$), то внутри мочевинового интермедиата может содержаться ~450, а в гуанидинхлориде ~230 молекул воды. (Для сравнения: внутри расплавленной глобулы α -лактальбумина может находиться около 270 молекул воды [38].) Суммируя количество молекул воды внутри глобулы рибонуклеазы и на ее поверхности (550), получаем, что полная гидратация мочевинового и гуанидинхлоридного интерме-

диатов характеризуется числом ~1000 и ~770 молекул воды, соответственно. Как видно, оба способа оценки полной гидратации дают удовлетворительно совпадающие результаты. Это, кстати, показывает, что предложенный нами путь вычисления объема из величин доступной поверхности достаточно корректен.

Присутствие воды внутри расплавленной глобулы делает понятными некоторые свойства интермедиатов. Прежде всего, это позволяет объяснить причину различной степени компактности расплавленных глобул в растворе мочевины и в растворе гуанидинхлорида. Известно, что инкремент радиуса глобулы при переходе в состояние «расплавленная глобула» варьирует для разных белков от 10 до 30% [29]. Меньшая величина инкремента характерна для белков, содержащих внутренние сшивки (дисульфидные связи). Рибонуклеаза имеет четыре таких связи, что и объясняет небольшое увеличение радиуса глобулы (см. таблицу), однако это не объясняет различие в инкрементах радиусов двух интермедиатов (18 и 10% в мочедине и гуанидинхлориде, соответственно). На наш взгляд, существуют по крайней мере две причины, объясняющие этот эффект. В ядро интермедиата в мочедине может проникать не только вода, но и молекулы мочевины, что приводит к дополнительному разворачиванию глобулы и к большему объему интермедиата. Такое вряд ли можно допустить для катионов гуанидиния, которым выгоднее взаимодействовать с белковыми группами на поверхности глобулы. Это согласуется с данными рентгеноструктурного анализа [44], согласно которым кристаллы α -химотрипсина, полученные из 3 М раствора мочевины и 2 М раствора гуанидинхлорида, дают различающиеся карты электронной плотности. В первом случае (с мочевиной) видны изменения как на поверхности глобулы, так и внутри нее, во втором — только на поверхности.

Другая причина различия в инкрементах радиусов интермедиатов связана со сжимающим действием на белок хлорид-анионов. Этот вывод вытекает из сопоставления результатов влияния на белок гуанидинхлорида и хлорида лития. Известно, что катионы гуанидиния (Gu^+) и Li^+ оказывают дестабилизирующее (разворачивающее) действие на белки, тогда как анионы стабилизируют их. Действие аниона и катиона аддитивно [45], и при малых концентрациях солей действие аниона очевидно превалирует над действием катиона, что и приводит к сжатию глобулы. При больших же концентрациях LiCl глобула вообще не разворачивается, поскольку дестабилизирующее действие Li^+ слабее действия Gu^+ .

Таким образом, меньший объем интермедиата в гуанидинхлориде, чем в мочедине, может быть обусловлен сжимающим действием ионов Cl^- и отсутствием молекул денатуранта внутри глобулы.

Присутствие молекул воды внутри расплавленных глобул объясняет механизм их возникновения и стабилизации. Уменьшение плотности внутримолекулярной упаковки и увеличение экспонированности гидрофобных остатков в расплавленных глобулах указывают на частичное разрушение взаимодействий (гидрофобных, водородного связывания и др.), стабилизирующих нативную структуру внутри глобулы. Этот дестабилизирующий эффект денатурирующих веществ может быть компенсирован образованием связей меж-

ду молекулами воды и полярными группами в молекуле белка внутри глобулы. Такой компенсационный механизм стабилизации был предложен в работе [38], где показано, что число молекул воды, находящихся внутри расплавленной глобулы α -лактальбумина равно числу полярных атомов внутри нее. Компенсирующая роль воды в стабилизации нативной структуры белка детально обсуждена в [46]. Основные положения этой работы применимы и к расплавленным глобулам, существование которых обусловлено присутствием мочевины и гуанидинхлорида, способных конкурировать с внешней водой за образование водородных связей с белком.

И наконец, иммобилизацией растворителя внутри интермедиатов можно объяснить тот факт, что повторно свернутый белок не возвращается в нативное состояние. В условиях нашего эксперимента удаление гуанидинхлорида происходит практически мгновенно, и повторное сворачивание белка скорее всего осуществляется в отсутствие сжимающего эффекта ионов Cl^- . Поэтому молекулы воды, захваченные в процессе повторного сворачивания белка, не могут быть вытеснены из расплавленной глобулы. Об увеличении как скорости, так и эффективности повторного сворачивания полипептидной цепи в присутствии стабилизирующих анионов (хлорида, сульфата, фосфата и др.) свидетельствуют данные работ [47, 48].

Таким образом, описанные выше структурные особенности интермедиатов разворачивания рибонуклеазы А в растворах мочевины и гуанидинхлорида — степень компактности, сохранение вторичных структур, увеличение экспонированности гидрофобных остатков, наличие нагивоподобной топологии и гидрофобного ядра — соответствуют фундаментальным характеристикам состояния «расплавленная глобула». Это прямо указывает на то, что рибонуклеаза А, для которой общепринято считать механизм денатурации как переход между двумя состояниями, на самом деле разворачивается через стадию образования расплавленной глобулы.

Заключение

Результаты представленных исследований однозначно говорят в пользу механизма сворачивания — разворачивания белков через стадию образования расплавленных глобул. Следует отметить, что состояние расплавленной глобулы не является артефактом для рибонуклеазы А, поскольку по крайней мере в растворе гуанидинхлорида оно реализуется как при разворачивании, так и при повторном сворачивании белковой молекулы. Это глобальное состояние всей полипептидной цепи белка, а не только части цепи, имеющей нативоподобную структуру, или смеси глобул с различной степенью сворачивания. На это указывает вид кривых, описывающих переходы $\text{N} \rightarrow \text{I}$ и $\text{I} \rightarrow \text{U}$, который соответствует кооперативному переходу между двумя состояниями в случае обоих денатурантов (мочевины и гуанидинхлорида). В этом отношении особенно важно, что кривые переходов, определенные с использованием разных параметров (доступная поверхность, оптическое вращение и ферментативная активность), совпадают, что является признаком перехода между двумя состояниями. Таким образом, для обоих денатурантов интермедиаты можно

рассматривать как отдельное, наряду с нативным и развернутым, состояние, как это и предполагалось в [3] для типичных расплавленных глобул. Очевидные структурные различия между интермедиатами в моче-вине и гуанидинхлориде обусловлены химической природой денатурирующих агентов. Отсюда следует, что состав среды, промотирующей разворачивание белковой молекулы, является критическим параметром, определяющим структуру интермедиатов для одного и того же белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kuwajima K.* Proteins: Structure, Function and Genetics, 1989, v. 6, p. 87.
2. *Dobson C.M.* Curr. Biol., 1994, v. 6, p. 636.
3. *Pititsyn O.B.* Advan. Protein Chem., 1995, v. 47, p. 83.
4. *Privalov P.L.* J. Mol. Biol., 1996, v. 258, p. 707.
5. *Dobson C.M., Pititsyn O.B.* Curr. Opin. Struct. Biol., 1997, v. 7, p. 1.
6. *Пфайл В.* Биохимия., 1998, v. 63, с. 349.
7. *Shakhnovich E.I.* Curr. Opin. Struct. Biol., 1997, v. 7, p. 29.
8. *Fersht A.R.* Ibid., 1997, v.7, p. 3.
9. *Птицын О.Б.* Биохимия, 1998, v. 4, с. 435.
10. *Baker D.* Nature, 2000, v. 405, p. 39.
11. *Baldwin R.L., Rose G.D.* Trends Biochem. Sci., 1999, v. 24, p. 77.
12. *Ginsburg A., Carrol W.R.* Biochemistry, 1965, v. 4, p. 2159.
13. *Pace C.N.* CRC Crit. Rev. Biochem., 1975, v. 3, p. 1.
14. *Saito J, Wada A.* Biopolymers, 1983, v. 22, p. 2105.
15. *Privalov P.L.* J. Mol. Biol., 1992, v. 226, p. 491.
16. *Benz F.W., Roberts G.C.K.* Ibid., 1975, v. 91, p. 367.
17. *Kiefhaber T., Labhardt A.M., Baldwin R.L.* Nature, 1995, v. 375, p. 513.
18. *Vołynskaya A.V., Kasumov E.A., Bogacheva E.N., Shishkov A.V., Goldanskii V.I.* Eur. Biophys. J., 1994, v. 23, p. 139.
19. *Шишков А.В., Баратова Л.А.* Успехи химии, 1994, v. 63, p. 825.
20. *Goldanskii V.I., Kashirin I.A., Shishkov A.V., Baratova L.A., Grebenshikov N.I.* J. Mol. Biol., 1988, v. 201, p. 567.
21. *Yusupov M.M., Spirin A.S.* Methods enzymol., 1988, v. 164, p. 426.
22. *Shishkov A.V., Goldanskii V.I., Baratova L.A., Fedorova N.V., Ksenofontov A.L., Zhirnov O.P., Galkin A.V.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, v. 96, p. 7826.
23. *Воынская А.В., Мурашова С.А., Скрипкин А.Ю., Шишков А.В., Гольданский В.И.* Мол. биология, 1989, т. 23, с. 356.
24. *Воынская А.В., Касумов Э.А., Шишков А.В.* Там же, 1998, т. 32, с. 463.
25. *Lee B., Richards F.M.* J. Mol. Biol. 1971, v. 55, p. 379.
26. *Crook E.M., Mathias A.P., Rabin B.R.*, Biochem. J., 1960, v. 74, p. 234.
27. *Dill K.A., Shortle D.* Annu. Rev. Biochem., 1991, v. 60, p. 795.
28. *Richards F.M.* Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1977, v. 6, p. 151.
29. *Kataoka M., Kuwajima K., Tokunaga F., Goto Y.* Protein Sci., 1997, v. 6, p. 422.
30. *Von Hippel P.H., Wong K.Y.* J. Biol. Chem., 1965, v. 240, p. 3909.
31. *Haynie D.T., Freire E.* Proteins: Structure, Function and Genetics., 1993, v. 16, p. 115.
32. *Jaenicke R.* Prog. Biophys. Molec. Biol., 1987, v. 49, p. 117.
33. *Warren J.C., Stowring L., Morales M.F.* J. Biol. Chem., 1966, v. 241, p. 309.
34. *Liu W., Tsou C-L.* Biochim. Biophys. Acta, 1987, v. 916, p. 465.
35. *Тсой С-Л.* Биохимия, 1998, т. 63, с. 300.
36. *Horowitz P.M.* In: Protein Folding. Ed. J.L. Cleland. Washington: American Chemical Society, 1993, p. 156.
37. *Finkelstein A.V., Shakhnovich E.I.* Biopolymers, 1989, v. 26, p. 1681.
38. *Kharakoz D.P., Bychkova V.E.* Biochemistry, 1997, v. 36, p. 1882.
39. *Kobashigawa Y., Sakurai M., Nitta K.* Protein Sci., 1999, v. 8, p. 2765.
40. *Karplus M., Sali A.* Curr. Opin. Struct. Biol., 1995, v. 5, p. 58.
41. *Caflish A., Karplus M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, v. 91, p. 1746.
42. *Cheung M.S., Garsia A.E., Onuchic J.N.* Ibid., 2002, v. 99, p. 685.
43. *Squire P.G., Himmel M.E.* Archiv. Biochem. Biophys., 1979, v. 196, p. 165.
44. *Hibbard L.S., Tulinsky A.* Biochemistry, 1978, v. 17, p. 5460.
45. *Ahmad F., Bigelov C.C.* J. Prot. Chem., 1986, v. 5, p. 355.
46. *Finney J.L., Gellatly B.J., Goodfellow J.* Biophys. J., 1980, v. 32, p. 17.
47. *Damodaran S.* Biochim. Biophys. Acta, 1987, v. 914, p. 114.
48. *Goto Y., Takahashi N, Fink A.L.* Biochemistry, 1990, v. 29, p. 3480.