

СРАВНЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ДИГИДРОФОЛАТРЕДУКТАЗЫ *E. coli* И ЧЕЛОВЕКА: ИССЛЕДОВАНИЕ РАВНОВЕСНОГО РАЗВОРАЧИВАНИЯ

© 2015 г. Ч. Таплиял, Н. Джейн*, П. Чаудхури (Чаттопадхуай)

Институт биотехнологий университета Амита, UP-201303, Уттар-Прадеш, Ноида, сектор-125, Индия;

*Школа биологических наук Индийского института технологий Дели, Индия

E-mail: pratimachaudhuri@yahoo.com

Поступила в редакцию

Различающиеся по происхождению белки могут проявлять разное физико-химическое поведение, иметь отличия в гомологии последовательностей, фолдинге, функциях. Поэтому изучение структурно-функциональной взаимосвязи белков из разных источников значимо в том смысле, что может привести к открытию сравнительных особенностей их взаимосвязей в ряду «последовательность–структура–функция». Дигидрофолатредуктаза – не только фермент, участвующий в регуляции клеточного цикла, но и значимый фермент при разработке противораковых препаратов. Поэтому детальное понимание структурно-функциональных взаимоотношений обширного числа вариантов дигидрофолатредуктазы будет иметь важное значение при подборе ингибитора или антагониста к данному ферменту, участвующему в процессах клеточного процесса развития. В представленной работе сообщается о сравнительной структурно-функциональной связи между дигидрофолатредуктазой *E. coli* и человека. Различия в характере разворачивания этих двух белков исследовались для понимания различий таких свойств этих белков, как их относительная стабильность и конформационные изменения при идентичных условиях денатурации. Механизм равновесного разворачивания дигидрофолатредуктазы при использовании гидрохлорида гуанидина в качестве денатурирующего агента и в присутствии различных типов осмолитов наблюдали путем регистрации ферментативной активности, а также собственной флуоресценции триптофана и внешнего флуорофора 8-анилино-1-нафталинсульфоновой кислоты в качестве зонда. Обнаружено, что такие осмолиты, как 1 М сахараза и 30% глицерин, обеспечивают повышенную стабильность обеих дигидрофолатредуктаз, причем степень стабилизации зависит от собственной стабильности белка, тогда как 100 мМ пролина не оказывают значимого стабилизирующего эффекта. Показано также, что дигидрофолатредуктаза человека относительно менее стабильна, чем ее аналог из *E. coli*.

Ключевые слова: дигидрофолатредуктаза *E. coli* и человека, разворачивание дигидрофолатредуктаз, мониторинг разворачивания дигидрофолатредуктаз, флуоресцентная спектроскопия, осмолиты и стабилизация дигидрофолатредуктаз.

Белки – одни из самых важных макромолекул в клетке, контролирующие практически все биологические процессы. Производство и детальная характеристика различных белков облегчаются благодаря их гетерологичной экспрессии и очистке [1]. Белок может быть функционально активен только тогда, когда приобретает уникальную 3D-конформацию за счет замысловатого пути сворачивания, на который влияют первичная аминокислотная последовательность и локальная клеточная среда [2]. Сворачивание белка является жизненно важным для живого организма, поскольку добавляет

плоть к скелету гена. Незначительные ошибки в процессе сворачивания могут привести к неправильно свернутым структурам, что иногда приводит к летальному исходу [3–5]. Однако в клеточной среде, имеющей высокую вязкость, многие белки не могут свернуться должным образом самостоятельно и нуждаются в помощи распространенных белков особого рода – молекулярных шаперонов. Молекулярные шапероны помогают другим белкам достичь функционально активной 3D-структуры и таким образом предупреждают формирование неправильно свернутых или агрегировавших структур.

Сокращения: ДГФР – дигидрофолатредуктаза, АНС – 8-анилино-1-нафталинсульфоновая кислота, GdnHCl – гидрохлорид гуанидина.

Дигидрофолатредуктаза (ДГФР, EC 1.5.1.3) является важным ферментом, который превращает дигидрофолат в тетрагидрофолат с ис-

пользованием НАДФН как донора электронов. «Челночная» метильная группа, переносчиком которой является тетрагидрофолат, необходима для первичного синтеза пуринов, тимидиловой кислоты и некоторых аминокислот. ДГФР очень важна как мишень для противораковых препаратов благодаря ингибированию метотрексатом. Кроме значимости в качестве фармакологической мишени, ДГФР привлекла внимание специалистов в химии белка как модель для изучения отношений структура/функция у ферментов из-за малого размера молекулы и доступности очищенного фермента. Подбор антагонистов или ингибиторов для любого фермента требует знания структурно-функциональных связей белка и оптимальных конформационных состояний для проявления максимальной и минимальной активности. Более того, подбор ингибиторов или медикаментозных препаратов, воздействующих на фермент, становится проще, если имеется информация о различных хорошо охарактеризованных промежуточных конформациях молекулы. Фолдинг *in vivo* любого рекомбинантного белка является важным параметром для понимания его способности к самостоятельному сворачиванию внутри клетки, что всегда определяет последующую процедуру очистки [6].

Есть работы по сравнению конформаций активных участков ДГФР человека и *E. coli*. Для ДГФР кишечной палочки предлагается гипотетическая модель для связывания субстрата, в которой птеридиновое кольцо переворачивается «с ног на голову», в то время как все атомы белка и растворителя остаются неподвижными [7]. Также были опубликованы предварительные исследования связывания ингибиторов метотрексата и триметоприма с апоферментом человека [8]. Конформации химически очень похожих лигандов метотрексата и фолиевой кислоты (первый – субстрат, а вторая – мощный ингибитор) различаются, по существу, в том, что их птеридиновые кольца ориентированы противоположно по отношению к их *p*-аминобензоил-L-глутамат-фрагментам. Связывание метотрексата аналогично тому, что ранее наблюдалось у двух бактериальных ферментов, но довольно сильно отличается от такового для фермента из клеточной линии лимфомы мышей [9]. Геометрия полипептидной цепи вокруг участка связывания фолата в ферменте человека не согласуется с выводами, сделанными ранее в отношении видовой селективности ингибитора триметоприма [10]. Таким образом, активные центры ДГФР *E. coli* и человека различаются по отношению к их кон-

формациям вокруг областей связывания субстрата.

С учетом важной роли ДГФР, существенными являются структурно-функциональные исследования этого фермента. Более того, поскольку ДГФР присутствует почти во всех типах прокариотических и эукариотических клеток, также важно сравнение физико-химических характеристик ДГФР из различных источников.

В данной статье мы сравниваем физико-химические параметры ДГФР *E. coli* и человека путем исследования траекторий разворачивания этих белков с помощью биохимических и биофизических подходов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

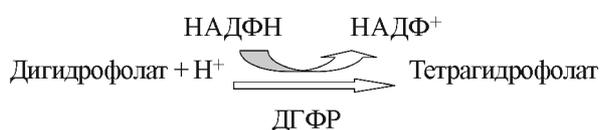
Материалы. Штаммы BL21 *E. coli* и Rosetta *E. coli* были использованы для экспрессии и очистки ДГФР *E. coli* и человека соответственно. Плазмиды ДГФР *E. coli*, клонированные в pET16b-вектор, содержащий (His)₆-ДГФР, с благодарностью приняты от д-ра Тагучи, UEDA-группа, Япония. Плазида ДГФР человека в векторе pET43.1a, содержащем (His)₆, получена от д-ра Цзы Фан, Тайвань. Изопропиловый β-D-1-тиогалактопиранозид, 8-анилино-1-нафталинсульфоновая кислота (АНС), дигидрофолатредуктаза, никотинамид-аденин-динуклеотидфосфат (НАДФН) и гидрохлорид гуанидина (GdnHCl) приобретены у Sigma Chemical Company (США). Имидазол высокого класса чистоты и хлорид натрия приобретены у компании Merck (Индия). Остальные используемые реагенты были аналитической чистоты.

Сверхэкспрессия и очистка рекомбинантных ДГФР. Компетентные клетки BL21 (DE3) / Rosetta (DE3) *E. coli* были получены с использованием CaCl₂ с помощью метода, описанного в работе [11]. Компетентные клетки трансформировали с помощью плазмиды ДГФР *E. coli* в pET16b-векторе и с помощью плазмиды ДГФР человека в pET43.1a-векторе соответственно, и выращивали на агаровой среде Луриа–Бертани, содержащей ампициллин в конечной концентрации 100 мкг/мл. *E. coli*, содержащие рекомбинантную плазмиду, His/pET16b ДГФР *E. coli* и His/pET43.1a ДГФР человека, выращивали в течение ночи при 37°C в 10 мл бульона Луриа, содержащего 100 мкг/мл ампициллина. Эту первичную культуру использовали для инокуляции 1 л того же бульона. Экспрессию и очистку ДГФР *E. coli* и человека проводили методом металл-аффинной хроматографии (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography, IMAC) с использованием Ni²⁺ в качестве хелатирующего агента согласно протоколам, приведенным в

работах [12] и [13] соответственно. Очистка обеих дигидрофолатредуктаз была подтверждена электрофоретическим анализом клеточного экстракта сверхэкспрессированных белков на 12% SDS-PAGE [14].

Определение концентрации белка с использованием реагента Брэдфорда. Концентрацию ДГФР определяли путем окрашивания по методу Брэдфорда с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта. Разбавленный в 50 раз белковый экстракт инкубировали с реагентом Брэдфорда при комнатной температуре в течение 20 мин, концентрацию белка оценивали по оптической плотности раствора на длине волны 595 нм.

Анализ ферментативной активности ДГФР. Активность ДГФР определяли методом кинетической спектроскопии при использовании следующей реакционной схемы [15]:



Анализ основан на способности дигидрофолатредуктазы катализировать обратимое НАДФН-зависимое восстановление дигидрофолата до тетрагидрофолиевой кислоты. Ход реакции регистрировали по уменьшению оптической плотности при длине волны 340 нм. Контрольная проба не содержала ДГФР и служила для оценки вклада от НАДФН. Оказалось, что величина оптической плотности «слепой» пробы незначительна по сравнению с результатом анализа в присутствии ДГФР. Следовательно, снижение концентрации НАДФН в присутствии ДГФР относится только к ферментативной реакции.

Снижение концентрации НАДФН регистрировали путем измерения поглощения при длине волны 340 нм и температуре 25°C. Стандартная смесь (1,0 мл) для анализа ДГФР *E. coli* содержала 3 М КСl в фосфат/цитратном буфере (25 мМ цитрата, 25 мМ фосфата были оттитрованы КОН до pH 6,0), 0,05 мМ дигидрофолиевой кислоты и 0,08 мМ НАДФН. Стандартная смесь для анализа ДГФР человека содержала аналитический буфер (25 мМ трис-НСl, 20 мМ КСl, pH 7,4), 0,05 мМ дигидрофолата и 0,07 мМ НАДФН. Одна единица активности определялась как количество фермента, необходимое для окисления 1 мкМ дигидрофолата в минуту, на основе молярного коэффициента экстинкции 12300 M⁻¹cm⁻¹ при длине волны 340 нм [16].

Исследование равновесного разворачивания ДГФР с помощью ферментативного анализа.

Ферментативную активность ДГФР измеряли вышеописанным методом. Образцы ДГФР с конечной концентрацией белка 0,2 мкМ содержали разные концентрации GdnHCl (0–5 М) в 10 мМ натрий-какодилатном буфере, pH 7,4, 50 мМ NaCl, для ДГФР *E. coli* и в 25 мМ трис-НСl-буфере, pH 7,4, 20 мМ КСl – для ДГФР человека. Далее строили график зависимости остаточной ферментативной активности белка от концентрации GdnHCl, чтобы получить кривую, демонстрирующую переход белка в развернутую конформацию [17].

Исследование равновесного разворачивания ДГФР по собственной флуоресценции триптофана. Измерения собственной флуоресценции белка проводили на спектрофлуориметре LS 55 (Perkin-Elmer, США) в кювете с длиной оптического пути 1 см. Образцы были приготовлены путем инкубации ДГФР в 20 мМ фосфата натрия, pH 7,4 (конечная концентрация белка 1 мкМ) с различными концентрациями GdnHCl (0–5 М) при 25°C в течение 30 мин. Длина волны возбуждения составляла 295 нм, спектры излучения записывали в диапазоне 310–400 нм, ширина входной щели для возбуждения и излучения равнялась 5 и 7,5 нм соответственно. Степень денатурации белка рассчитывали из значений интенсивности флуоресценции триптофана нативного белка и в присутствии различных концентраций денатурирующего агента.

Исследование равновесного разворачивания ДГФР в присутствии осмолитов с помощью ферментативного анализа. Ферментативную активность ДГФР в присутствии различных осмолитов (30% глицерина, 1 М сахарозы, 100 мМ пролина) измеряли вышеописанным методом. Образцы ДГФР с конечной концентрацией белка 0,2 мкМ содержали разные концентрации GdnHCl (0–3 М) в 10 мМ натрий-какодилатном буфере, pH 7,4, 50 мМ NaCl, для ДГФР *E. coli* и в 25 мМ трис-НСl-буфере, pH 7,4, 20 мМ КСl – для ДГФР человека. Затем анализировали ферментативную активность белка в зависимости от концентрации GdnHCl.

Исследование равновесного разворачивания ДГФР в присутствии осмолитов по собственной флуоресценции триптофана. Измерения собственной флуоресценции ДГФР в присутствии различных осмолитов (30% глицерина, 1 М сахарозы, 100 мМ пролина) проводили на спектрофлуориметре LS 55 (Perkin-Elmer, США) в кювете с длиной оптического пути 1 см. Образцы были приготовлены путем инкубации ДГФР в 10 мМ натрий-какодилатном буфере, 50 мМ NaCl, pH 7,4 (конечная концентрация белка 1 мкМ) с различными концентрациями GdnHCl (0–3 М) при 25°C в течение 30 мин.

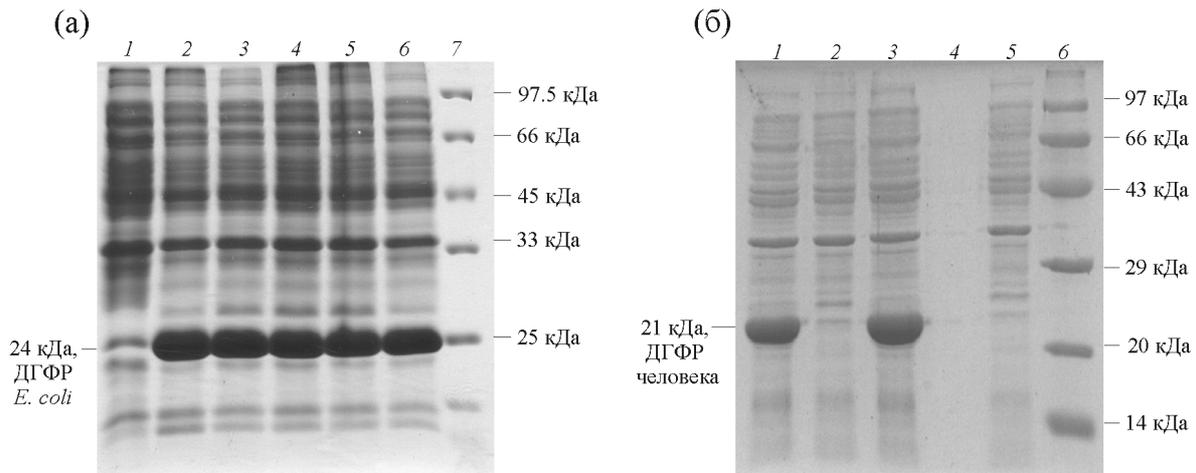


Рис. 1. Демонстрация сверхэкспрессии ДГФР с помощью 12% SDS-гель-электрофореза. (а) – ДГФР *E. coli*: дорожка 1 – образец из неиндуцированных клеток; дорожки 2–6 – образцы из индуцированных клеток; дорожка 7 – маркер белков с низкой молекулярной массой; (б) – ДГФР человека: дорожки 1, 3 – образцы из индуцированных клеток; дорожки 2, 5 – образцы из неиндуцированных клеток; дорожка 6 – маркер белков с низкой молекулярной массой; дорожка 4 – пустая.

Длина волны возбуждения составляла 295 нм, спектры излучения регистрировали в диапазоне 310–400 нм, ширина входной щели для возбуждения и излучения равнялась 5 и 7,5 нм соответственно [18]. Степень денатурации рассчитывали из данных по относительной интенсивности флуоресценции фермента с учетом, что интенсивность флуоресценции нативного белка соответствует 0% денатурации, а максимальная величина интенсивности флуоресценции – 100% денатурации. Чтобы получить кривую разворачивания ДГФР, данные о степени денатурации белка наносили на график относительно концентрации GdnHCl.

Исследование равновесного разворачивания ДГФР в присутствии осмолитов с помощью несобственной флуоресцентной спектроскопии. Измерения несобственной флуоресценции ДГФР (в присутствии АНС) при добавлении различных осмолитов (30% глицерина, 1 М сахарозы, 100 мМ пролина) проводили на спектрофлуориметре LS 55 (Perkin-Elmer, США) в кювете с длиной оптического пути 1 см. Образцы были приготовлены путем инкубации ДГФР в 10 мМ натрий-какодилатном буфере, 50 мМ NaCl, pH 7,4 (конечная концентрация белка 1 мкМ) с различными концентрациями GdnHCl (0–3 М) при 25°C в течение 30 мин. Конечная концентрация АНС во всех случаях составляла 50 мкМ [18]. Длина волны возбуждения равнялась 370 нм, спектры излучения регистрировали в диапазоне 410–600 нм, ширина входной щели для возбуждения и излучения равнялась 5 и 7,5 нм соответственно. Спектры излучения были скорректированы на «сле-

пы» пробы GdnHCl для каждой концентрации. Величины относительной интенсивности флуоресценции белок-связанного АНС наносили на график относительно концентрации GdnHCl.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сверхэкспрессия и очистка рекомбинантного ДГФР. Сверхэкспрессия рекомбинантного ДГФР была подтверждена с помощью электрофореза в 12% SDS-PAGE (рис. 1а,б). Видно, что в очищенных фракциях молекулярная масса ДГФР *E. coli* составляет ~24 кДа (рис. 2а), а ДГФР человека – ~21 кДа (рис. 2б).

Результаты изучения равновесного разворачивания ДГФР по изменению ферментативной активности. Равновесное разворачивание ДГФР изучали, анализируя активность фермента, денатурированного GdnHCl. Далее строили график зависимости остаточной ферментативной активности белка (в пересчете активность нативного фермента) от концентрации GdnHCl, как показано на рис. 3. В процессе разворачивания активность ДГФР *E. coli* исчезала при концентрации GdnHCl, равной 2 М, тогда как ДГФР человека теряла активность при концентрации GdnHCl около 1 М.

Результаты изучения равновесного разворачивания ДГФР с помощью собственной флуоресценции триптофана. Флуоресценцию триптофана ДГФР *E. coli* и человека измеряли в широком диапазоне концентраций GdnHCl (0–5 М) при 25°C. Далее значения относительной интенсивности излучения наносили на график в виде зависимости от концентрации GdnHCl.

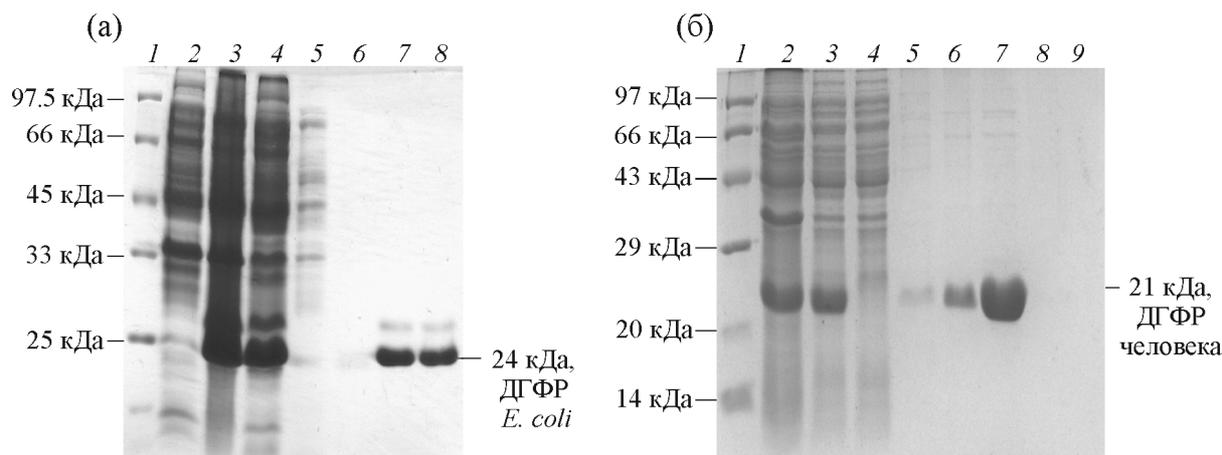


Рис. 2. Очистка ДГФР методом никелевой аффинной хроматографии (12% SDS-гель-электрофорез). (а) – Профиль очистки *E. coli* ДГФР: дорожка 1 – маркер белков с низкой молекулярной массой; дорожка 2 – образец неиндуцированных клеток BL21DE3; дорожка 3 – осадок, полученный после обработки ультразвуком лизированных индуцированных клеток; дорожка 4 – неочищенный супернатант, нанесенный на аффинную колонку; дорожка 5 – перетекание пробы во время нанесения; дорожка 6 – промывка; дорожка 7 – очищенная ДГФР; дорожка 8 – очищенная ДГФР после удаления имидазола диализом. (б) – Профиль очистки ДГФР человека: дорожка 1 – маркер белков с низкой молекулярной массой; дорожка 2 – осадок, полученный после обработки ультразвуком лизированных индуцированных клеток; дорожка 3 – супернатант, нанесенный на аффинную колонку; дорожка 4 – перетекание пробы во время нанесения; дорожки 5–9 – различные фракции, полученные при аффинной хроматографии.

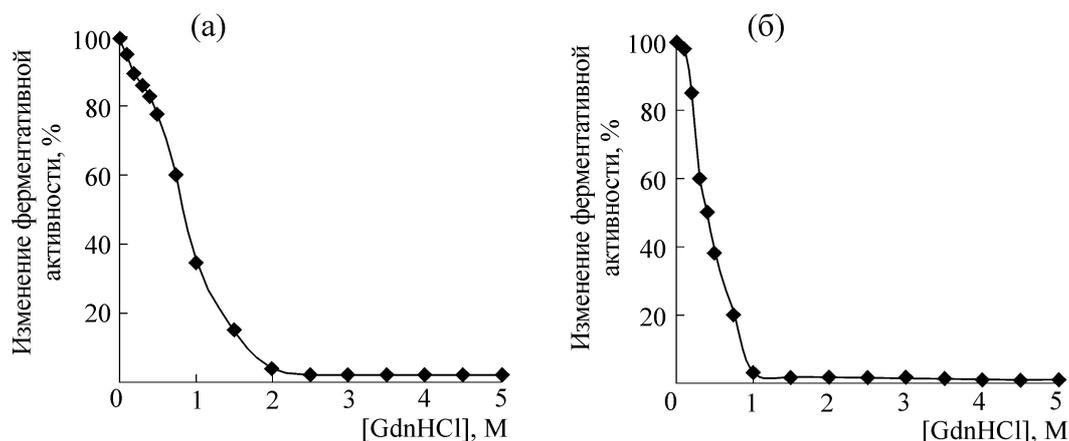


Рис. 3. Равновесное разворачивание ДГФР *E. coli* (а) и человека (б), продемонстрированное с помощью ферментативного анализа (подробное описание смотри в тексте).

Профили денатурации ДГФР, полученные методом собственной флуоресценции триптофана, представлены на рис. 4. Было обнаружено, что ДГФР *E. coli* и человека проявляют максимальные изменения в флуоресценции при концентрации GdnHCl около 3 М и 1 М соответственно. Этот результат указывает на более низкую конформационную стабильность ДГФР человека по сравнению с белком *E. coli* при данных условиях.

Результаты изучения равновесного разворачивания ДГФР в присутствии осмолитов по изменению ферментативной активности. Чтобы понять роль осмолитов в стабилизации моле-

кулы ДГФР, разворачивание ДГФР было также изучено в присутствии ряда различных осмолитов (30% глицерина, 1 М сахарозы, 100 мМ пролина). Для этого измеряли ферментативную активность денатурированного GdnHCl фермента в присутствии осмолитов и вычисляли долю активности денатурированного фермента по отношению к активности нативного фермента. Данные по ферментативной активности были нанесены на график относительно концентрации GdnHCl, как показано на рис. 5. Активность ДГФР *E. coli* в отсутствие осмолитов исчезала при концентрации GdnHCl около 2,2 М (рис. 5а), а в присутствии глицерина и

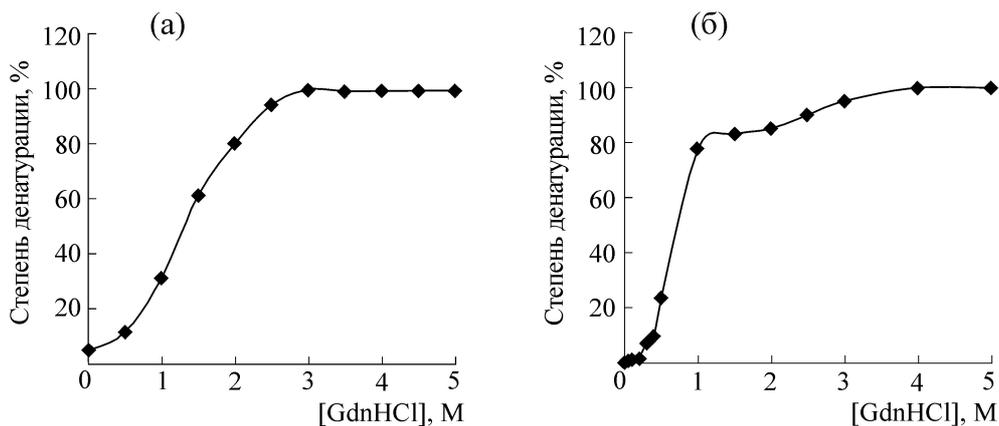


Рис. 4. Равновесное разворачивание ДГФ *E. coli* (а) и человека (б), продемонстрированное по изменению собственной флуоресценции триптофана.

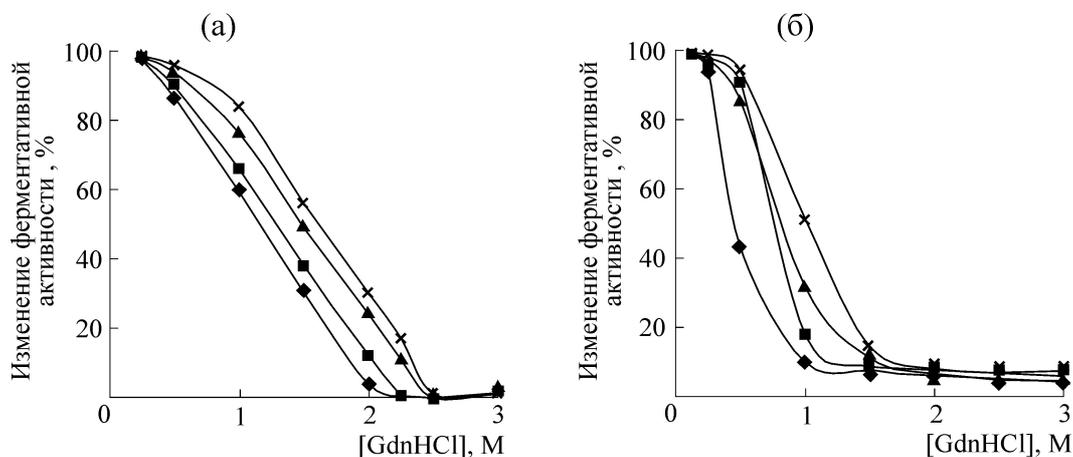


Рис. 5. Равновесное разворачивание ДГФ *E. coli* (а) и человека (б) в присутствии осмолитов, продемонстрированное с помощью ферментативного анализа. Обозначения: ромб – ДГФ без осмолитов, квадрат – ДГФ + 100 мМ пролин, треугольник – ДГФ + 1 М сахарозы, крестик – ДГФ + 30% глицерина.

сахарозы – при концентрации GdnHCl около 2,5 М. При этом пролин не приводил к какой-либо заметной стабилизации ДГФ *E. coli*. В случае ДГФ человека в отсутствие осмолитов фермент терял активность при концентрации GdnHCl около 1,5 М (рис. 5б), а в присутствии глицерина и сахарозы – при концентрации GdnHCl около 2 М. Следовательно, количество стабилизирующего осмолита имеет значение для обеих молекул ДГФ.

Результаты изучения равновесного разворачивания ДГФ в присутствии осмолитов с помощью собственной флуоресценции триптофана. Влияние осмолитов на стабилизацию ДГФ *E. coli* и человека исследовали также по изменению флуоресценции триптофана при денатурации фермента под действием GdnHCl. Значения интенсивности флуоресценции наносили на график относительно концентрации GdnHCl, как показано на рис. 6. Было обнаружено, что

максимальное изменение интенсивности флуоресценции триптофана для ДГФ *E. coli* в отсутствие осмолитов происходило при концентрации GdnHCl около 2,2 М (рис. 6а), а в присутствии глицерина и сахарозы – при концентрации GdnHCl примерно 2,5 М. Пролин же не влиял на флуоресценцию ДГФ *E. coli* в процессе GdnHCl-индуцированной денатурации. В случае ДГФ человека (рис. 6б) в отсутствие осмолитов максимальное изменение флуоресценции триптофана происходило при концентрации GdnHCl 1,5 М, в то время как в присутствии глицерина и сахарозы – при концентрации GdnHCl 2,0 М. В данном случае пролин также не оказывал влияния на флуоресценцию. Таким образом, снова было показано, что количество стабилизирующего осмолита имеет значение для обеих молекул ДГФ.

Результаты изучения равновесного разворачивания ДГФ в присутствии осмолитов с по-

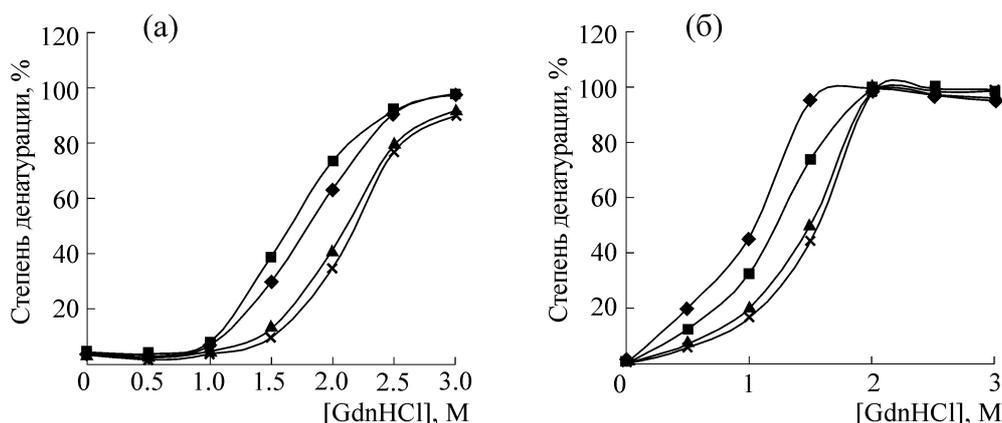


Рис. 6. Равновесное разворачивание ДГФ *E. coli* (а) и человека (б), продемонстрированное по изменению собственной флуоресценции триптофана. Обозначения: ромб – ДГФ без осмолитов, квадрат – ДГФ + 100 мМ пролина, треугольник – ДГФ + 1 М сахарозы, крестик – ДГФ + 30% глицерина.

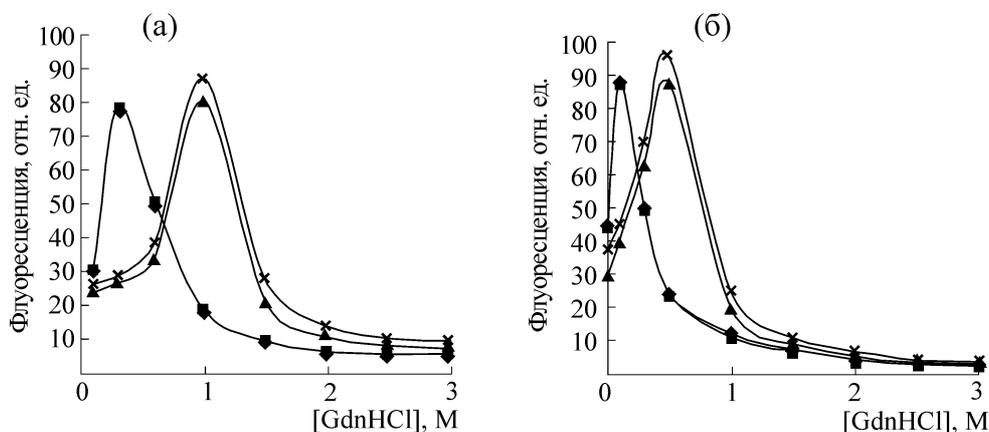


Рис. 7. Равновесное разворачивание ДГФ *E. coli* (а) и человека (б), продемонстрированное по измерению несобственной флуоресценции ДГФ (с зондом АНС) в присутствии осмолитов. Обозначения: ромб – ДГФ без осмолитов, квадрат – ДГФ + 100 мМ пролина, треугольник – ДГФ + 1 М сахарозы, крестик – ДГФ + 30% глицерина.

мощью несобственной флуоресцентной спектроскопии. Дифференциальная стабилизация ДГФ *E. coli* и человека была также исследована методом несобственной флуоресцентной спектроскопии. Гидрофобные свойства поверхности ферментов, денатурированных GdnHCl в присутствии осмолитов, сравнивали со свойствами нативных ферментов. Значения гидрофобности поверхности, основанные на данных по связыванию АНС белками, наносили на график в виде зависимости от концентрации GdnHCl (0–3 М). Было отмечено, что в отсутствие осмолитов ДГФ *E. coli* достигает конформации с относительно высокой гидрофобностью поверхности при концентрации GdnHCl 0,3 М (рис. 7а). В присутствии 30% глицерина или 1 М сахарозы конформация с наибольшей гидрофобностью поверхности получена при концентрации GdnHCl около 1,0 М. Однако в

присутствии 100 мМ пролина конформация с более высокой гидрофобностью поверхности была достигнута при концентрации GdnHCl, сравнимой с концентрацией в отсутствие осмолитов. Это отчетливо свидетельствует, что осмолиты могут стабилизировать конформацию нативного белка ДГФ кишечной палочки и задерживать достижение белком конформации с более высокой гидрофобностью поверхности в процессе GdnHCl-индуцированного процесса денатурации.

В случае ДГФ человека результаты наблюдения несколько отличаются от результатов, полученных для ДГФ *E. coli*. Сама по себе ДГФ человека достигает относительно высокой гидрофобности поверхности при концентрации GdnHCl 0,1 М (рис. 7б). В присутствии 30% глицерина или 1 М сахарозы конформация с более высокой гидрофобностью поверхности

достигается при концентрации GdnHCl около 0,5 М. В присутствии 100 мМ пролина конформация с более высокой гидрофобностью поверхности для ДГФР человека, как и в случае ДГФР *E. coli*, была достигнута при концентрации GdnHCl, сравнимой с таковой в отсутствие осмолита. Результаты говорят о том, что осмолиты могут стабилизировать конформацию нативного белка ДГФР человека и задерживать достижение конформации более высокой гидрофобности поверхности в процессе GdnHCl-индуцированного процесса денатурации. Таким образом, количество стабилизирующего осмолита имеет важное значение для обеих молекул ДГФР, хотя природа их стабилизации может незначительно различаться.

ОБСУЖДЕНИЕ

Спектроскопический мониторинг разворачивания ДГФР при различных концентрациях денатурирующего агента дает информацию об изменении в элементах вторичной и третичной структуры при денатурации. Осмолиты, такие как глицерин, сахароза, трегалоза, пролин и т.д., природные соединения, которые, как сообщалось ранее, могут выступать в роли белковых стабилизаторов. При исследованиях денатурации ДГФР *E. coli* и человека в присутствии различных типов осмолитов экспериментальные данные позволяют получить некоторую информацию о том, могут ли эти белки стабилизироваться осмолитами и есть ли какие-либо различия в природе и степени стабилизации. Подобные исследования полезны для сравнения физико-химических свойств различных белковых молекул или вариантов одного и того же белка. При изучении равновесного разворачивания ДГФР по изменению ферментативной активности было обнаружено, что ДГФР *E. coli* полностью потеряла свою активность при концентрации GdnHCl около 2 М, в то время как ДГФР человека продемонстрировала полную потерю активности при концентрации GdnHCl около 1 М. Экспериментальные данные подтвердили структурную информацию о том, что геометрия активного центра для ДГФР *E. coli* и человека различна [9]. Полученные результаты также указывают на более высокую стабильность ДГФР *E. coli* по сравнению с ее аналогом у человека. Для того чтобы иметь более детальную информацию о характере их общей структуры, может быть полезен контроль процесса разворачивания с помощью особого зонда, чувствительного к третичной структуре белков. Так, когда разворачивание ДГФР *E. coli* и человека изучали с

помощью собственной флуоресцентной спектроскопии, было установлено, что максимальное изменение интенсивности эмиссии флуоресценции произошло при концентрации GdnHCl около 3 и 1 М соответственно. Этот результат показывает, что для белка *E. coli* активный центр разрушается раньше, чем происходит разрушение всей третичной структуры. В случае ДГФР человека потеря активности и разрушение третичной структуры происходят одновременно. Предполагается, что эти тонкие свойства связаны с общими различиями в архитектуре ДГФР *E. coli* и человека.

GdnHCl – заряженный хаотропный агент, который денатурирует белок, разрушая водородные связи. Будучи заряженным по своей природе, он также стабилизирует денатурированное состояние при взаимодействии с поверхностью белка. Он постепенно разворачивает белок путем все большего ослабления водородных связей. Поэтому степень денатурации зависит от концентрации денатурирующего агента, используемого для процесса уравнивания. Для белков наблюдается корреляция между степенью денатурации и концентрацией GdnHCl, однако величины C_m (средняя точка зависимости от концентрации денатуранта) являются уникальной характеристикой белков, связанной с его термодинамической устойчивостью.

Для сравнения дифференциальной стабильности белков интенсивность эмиссии флуоресценции триптофана дает некоторые сведения об изменении их третичной структуры. В случае ДГФР *E. coli* при концентрации GdnHCl до 0,75 М изменений в интенсивности собственной флуоресценции триптофана белка не так много. При дальнейшем повышении концентрации GdnHCl происходит резкое падение интенсивности флуоресценции до тех пор, пока не достигается почти постоянное ее значение, при этом λ_{max} сдвигается в сторону больших длин волн. В случае ДГФР человека при концентрации GdnHCl до 0,5 М было обнаружено небольшое изменение интенсивности собственной флуоресценции триптофана. Выше этой концентрации начинается денатурация белка, которая становится почти постоянной после 1 М GdnHCl. Это означает, что внутренняя термодинамическая устойчивость ДГФР *E. coli* выше, чем у ДГФР человека. Осмолиты, такие как 1 М сахарозы и 30% глицерина, придают повышенную устойчивость ДГФР в обоих случаях. При анализе осмолит-индуцированной стабилизации обоих белков было обнаружено, что уровень стабилизации каким-то образом связан с их внутренней стабильностью. Например, са-

хароза и глицерин смещают точку полной деактивации ДГФР *E. coli* с концентрации GdnHCl 2,2 до 2,5 М, а в случае ДГФР человека – с 1,5 до 2 М. При сравнении несобственной флуоресценции ДГФР *E. coli* и человека в присутствии различных концентраций GdnHCl было отмечено, что эти белки обладали максимальной гидрофобностью поверхности при различных концентрациях денатуранта – ДГФР *E. coli* и человека имели максимумы связывания АНС при концентрации GdnHCl, равной 0,3 и 0,1 М соответственно. Осмолиты (30% глицерина и 1 М сахарозы) сместили максимальные значения гидрофобности поверхности к концентрации GdnHCl, равной 1 и 0,5 М соответственно. АНС является внешним флуоресцентным зондом, чувствительным к гидрофобному характеру поверхности белковых молекул [19]. АНС (или бис-АНС) связывается с открытыми гидрофобными участками на поверхности белка и начинает флуоресцировать при длине волны около 500 нм. Конформационный переход как функция концентрации денатурирующего агента может отслеживаться по степени связывания АНС с молекулой белка. Например, если частичная денатурация белка затрагивает гидрофобные участки, то увеличивается связывание АНС в процессе уравнивания с промежуточным уровнем денатурации. Более того, 1,8-бис-АНС и АНС оказались зондами, чувствительными к частично свернутым промежуточным продуктам в процессе белкового фолдинга. В этих ситуациях обнаруживаются преимущества существенного усиления флуоресценции, проявляемого амфифильными красителями, когда снижается воздействие на них воды. Как следствие, флуоресценция зонда АНС существенно возрастает, если белки, с которыми он связан, совершают переходы из полностью развернутого в частично свернутые состояния, приводящие к экранированию от воды. Промежуточные состояния «расплавленной» глобулы характеризуются особо высокой интенсивностью флуоресценции АНС благодаря доступности внутренних гидрофобных областей, которые были недоступны для красителя в случае нативной структуры [20].

Таким образом, результаты дифференциального связывания зонда АНС с ДГФР *E. coli* и человека подтверждают общие различия в конформационных свойствах этих двух белков, вы-

явленные при кристаллографических исследованиях [9].

Авторы благодарят за финансовую помощь Институт биотехнологии университета Амита (Ноида, Индия) и за техническую помощь – Индийский институт технологии, Дели, Индия. Доктор П. Чаундури выражает признательность за финансирование Совету по научным и промышленным исследованиям, СНПИ, Правительство Индии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. M. Dobson, Phil. Trans. Roy. Soc. Lond., Ser. B, Biol. Sci. **356** (1406), 133 (2001).
2. C. B. Anfinsen, Science **181** (4096), 223 (1973).
3. R. J. Ellis and T. J. Pinheiro, Nature **416**, 483 (2002).
4. A. R. Kinjo and S. Takada, Biophys. J. **85**, 3521 (2003).
5. T. K. Chaudhuri, G. W. Farr, W. A. Fenton, et al., Cell **107** (2), 235 (2001).
6. B. I. Schweitzer, et. al., FASEB J. **4** (8), 2441 (1990).
7. J. T. Bolins, D. J. Filman, D. A. Matthews, et al., J. Biol. Chem. **257** (22), 13650 (1982).
8. L. A. Wallace and C. R. Matthews, J. Mol. Biol. **315**, 193 (2002).
9. D. K. Stammers, J. N. Champness, C. R. Beddell, et al., FEBS Lett. **218**, 178 (1987).
10. D. A. Matthews, J. T. Bolin, J. M. Burridge, et al., J. Biol. Chem. **260**, 392 (1985).
11. J. Sambrook and D. Russell, *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001).
12. J. Mittal, R. Gayathri, T.K. Chaudhuri, and P. Chaudhuri, J. Biophys. Chem. **1** (2), 694 (2010).
13. T. T. Kao, K. C. Wang, W. N. Chang, et al., Drug Metab. Dispos. **36** (3), 508 (2008).
14. U. K. Laemmli, Nature **227** (5259), 680 (1970).
15. B. L. Hillcoat, P. F. Nixon, and R. L. Blakley, Anal. Biochem. **21**, 178 (1967).
16. K. Aiso, T. Nozaki, M. Shimoda, and E. Kokue, Anal. Biochem. **272** (2), 143 (1999).
17. R. Ionescu, V. F. Smith, J. C. O'Neil, and C. R. Matthews, Biochemistry **39** (31), 9540 (2000).
18. R. Horst, W. A. Fenton, S. W. Englander, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **104** (54), 20788 (2007).
19. O. K. Gasymov and B. J. Glasgow, Biochim. Biophys. Acta **1774** (3), 403 (2007).
20. G. V. Semisotnov, N. A. Rodionova, O. I. Razgulyaev, et al., Biopolymers **31**, 119 (1991).

Comparison of Physico-chemical Aspects between *E. coli* and Human Dihydrofolate Reductase: an Equilibrium Unfolding Study

Charu Thapliyal*, Neha Jain**, and Pratima Chaudhuri (Chattopadhyay)*

*Amity Institute of Biotechnology, Amity University, Noida, Uttar Pradesh, India

**School of Biological Sciences, Indian Institute of Technology Delhi, India

A protein, differing in origin, may exhibit variable physicochemical behaviour, difference in sequence homology, fold and function. Thus studying structure-function relationship of proteins from altered sources is meaningful in the sense that it may give rise to comparative aspects of their sequence–structure–function relationship. Dihydrofolate reductase is an enzyme involved in cell cycle regulation. It is a significant enzyme as a target for developing anticancer drugs. Hence, detailed understanding of structure–function relationships of wide variants of the enzyme dihydrofolate reductase would be important for developing an inhibitor or an antagonist against the enzyme involved in the cellular developmental processes. In this communication, we have reported the comparative structure-function relationship between *E. coli* and human dihydrofolate reductase. The differences in the unfolding behaviour of these two proteins have been investigated to understand various properties of these two proteins like relative stability differences and variation in conformational changes under identical denaturing conditions. The equilibrium unfolding mechanism of dihydrofolate reductase proteins using guanidine hydrochloride as a denaturant in the presence of various types of osmolytes has been monitored using loss in enzymatic activity, intrinsic tryptophan fluorescence and an extrinsic fluorophore 8-anilino-1-naphthalene-sulfonic acid as probes. It has been observed that osmolytes, such as 1M sucrose, and 30% glycerol, provided enhanced stability to both variants of dihydrofolate reductase. Their level of stabilisation has been observed to be dependent on intrinsic protein stability. It was observed that 100 mM proline does not show any significant stabilisation to either of dihydrofolate reductases. In the present study, it has been observed that the human protein is relatively less stable than the *E.coli* counterpart.

Key words: human, Escherichia coli dihydrofolate reductase, unfolding dihydrofolate reductase proteins, monitoring of DHFR unfolding, fluorescence spectroscopy, osmolytes and dihydrofolate reductase stabilisation