

ПОДХОД, ПОЗВОЛЯЮЩИЙ ОПРЕДЕЛИТЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ РАЗРУШЕНИЯ СТРУКТУРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ БЕЛКА ПРИ ЕГО РАЗВОРАЧИВАНИИ. ИССЛЕДОВАНИЕ КАРБОКСИАНГИДРАЗЫ Б

© 2016 г. Б.С. Мельник, Г.С. Нагибина, А.С. Глухов, Т.Н. Мельник

Институт белка РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 4

E-mail: tmelnik@vega.protres.ru

Поступила в редакцию 15.06.16 г.

Использован экспериментальный подход, названный μ -анализом, позволяющий понять последовательность разрушения структурных элементов белка при его денатурации. Этот подход применим для исследования белков, сворачивание/разворачивание которых проходит в несколько стадий, через образование/разрушение ряда промежуточных состояний. Суть подхода состоит в систематическом исследовании мутантных форм белка с одиночными заменами гидрофобных аминокислотных остатков и с введенными цистеиновыми мостиками. При этом заменяемые аминокислотные остатки должны быть в одних и тех же структурных элементах белка. Одиночные замены гидрофобных аминокислотных остатков в основном позволяют получить информацию о структурных элементах белка, которые разрушаются на последних этапах его денатурации. Введение цистеиновых мостиков на поверхности белка позволяет исследовать структурные элементы белка, которые разворачиваются первыми при денатурации белка. Проведя калориметрические исследования неравновесного плавления бычьей карбоксиангидразы Б, мы получили информацию о константах скоростей разворачивания десяти мутантных форм белка. Анализ влияния мутаций на скорости разных этапов разворачивания белка позволил определить последовательность разрушения структурных элементов карбоксиангидразы Б при тепловой денатурации.

Ключевые слова: сворачивание белка, денатурация белка, кинетика, мутационный анализ, введение SS-связей, карбоксиангидраза Б.

За многие годы исследования глобулярных белков получено большое количество информации об их структуре, функции, скоростях сворачивания, стабильности, взаимодействии с лигандами (см., например, [1]). Большая часть исследований процесса сворачивания глобулярных белков была выполнена исключительно на небольших белках, сворачивание которых проходит в одну стадию. В результате интенсивных исследований процессов денатурации и ренатурации малых глобулярных белков были разработаны экспериментальные подходы, позволяющие получать информацию о влиянии отдельных аминокислотных остатков на энергетический ландшафт белка (см., например, [2,3]). Один из таких подходов – это метод Φ -анализа, который позволяет определить аминокислотные остатки, входящие в так называемое «ядро сворачивания» (т.е. в структурированную часть «переходного состояния» белка). Этот подход применяется в основном для белков, денатурация/ренатурация которых протекает в одну стадию, и заключается в измерении и анализе

скоростей сворачивания и разворачивания белка дикого типа и его мутантных форм с одиночными заменами аминокислотных остатков при разных концентрациях денатуранта [4–6]. Вместе с тем процессы денатурации и ренатурации сравнительно больших белков (более 20 кДа), происходящие по многостадийному механизму (т.е. с накоплением более одного промежуточного состояния), изучены крайне недостаточно. Экспериментальное изучение таких сложных белков, имеющих стабильные промежуточные состояния на пути сворачивания, встречает ряд трудностей. В основном это трудности, возникающие при обработке и интерпретации достаточно сложных кинетических данных, поскольку чем больше в белке различных состояний, тем труднее их отличить, понять последовательность их формирования и оценить взаимное влияние различных состояний друг на друга.

Ранее нами был предложен подход, названный μ -анализ, позволяющий определить последовательность разрушения элементов вторич-

ной структуры белка при его денатурации [7]. Проанализировав литературные данные по исследованию влияния SS-связей на белки [8–11] и по исследованию белков, сворачивание которых проходит в несколько стадий (см., например, [10,12]), можно сделать вывод, что введенные в белок SS-связи влияют в основном на ранние стадии сворачивания белка, в то время как одиночные замены гидрофобных аминокислотных остатков – в основном на поздние [13]. Поэтому суть предложенного нами подхода состоит в систематическом исследовании влияния на белок двух видов мутаций – замен гидрофобных аминокислотных остатков с большим количеством контактов и введение на поверхности белка SS-мостиков. При этом одиночная замена аминокислотного остатка и введение SS-мостика должны быть сделаны в одном и том же структурном элементе белка.

В этой работе мы исследовали тепловую денатурацию бычьей карбоксиангидразы Б, сворачивание/разворачивание которой происходит как минимум в три стадии, т. е. через формирование двух промежуточных состояний [14–17]. Мы исследовали тепловую денатурацию шести мутантных форм карбоксиангидразы Б с одиночными заменами гидрофобных аминокислотных остатков и четыре мутантные формы этого белка с введенными цистеиновыми мостиками. Анализ влияния этих двух видов мутаций на скорости разных этапов разворачивания карбоксиангидразы позволил определить последовательность разрушения ее структурных элементов при тепловой денатурации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспрессия гена белка карбоксиангидразы и его мутантных форм в штамме-суперпродуценте *E. coli*. Тотальная РНК, выделенная из клеток красного костного мозга быка, была использована для синтеза кДНК бычьей карбоксиангидразы II (BCAВII) в результате реакции обратной транскрипции с использованием генспецифического олигонуклеотида 3'-CA2 (5'-ttgtcgacGGCCAGTTCACCAAGTGGACTTGTG-3') и обратной транскриптазы M-MuLV (Fermentas, США). кДНК была использована для амплификации фрагмента ДНК, кодирующего BCAВII, в результате ПЦР с использованием олигонуклеотидов 5'-CA2 (5'-tacttttcatATGTCCCATCACTGGGGATAC-3') и 3'-CA2 и Pfu ДНК-полимеразы (Fermentas, США). Продукты ПЦР обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NdeI и SalI (Fermentas, США) и лигировали с плазмидной ДНК pET11c_joe, обработанной соответствующими эндонуклеазами рестрикции. Полученный рекомбинантный вектор, кодирующий BCAВII, был обозначен как

pBCAV. Рекомбинантные вектора, кодирующие мутантные формы BCAВII, были получены с использованием набора «QuikChangeLightning-Site-DirectedMutagenesisKit» (Agilent Technologist, США). Получение запланированных генетических конструкций подтверждалось секвенированием. Клетки *E. coli* BL21(DE3) трансформировали плазмидами pET-11c-BCAV, содержащими ген белка карбоксиангидразы II (BCAВII), и высевали в жидкой среде LB с антибиотиком (ампициллин 100 мкг/мл). В среду LB добавляли хлорид цинка до концентрации 1 mM для получения холоформы рекомбинантного белка карбоксиангидразы. Биомассу наращивали при 37°C при интенсивной аэрации до оптической плотности $OD_{600} = 0,7-1,0$ о.е., затем клетки индуцировались изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом в концентрации 1 mM при 37°C до достижения оптической плотности 1,5 о.е. Биомассу осаждали центрифугированием при температуре 4°C в течение 40 мин при 4000 g. Аналогичным образом проводили экспрессию мутантных генов белка карбоксиангидразы.

Выделение и очистка белка карбоксиангидразы и его мутантных форм из штамма-суперпродуцента *E. coli*. Биомассу ресуспендировали в 50 мл буфера TE (20 mM трис-HCl, pH 8,0, 1 mM ЭДТА), содержащего 0,1 мг/мл лизоцима, и инкубировали в течение 30 мин при 25°C. Разрушение биомассы проводили в полипропиленовых пробирках на ультразвуковом дезинтеграторе. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при температуре 4°C в течение 60 мин при 15000 g. Очистку белка с некоторыми модификациями проводили, как описано в работе [18]. Гомогенность препарата белка контролировали с помощью гель-электрофореза в нативных и денатурирующих условиях. Нативность рекомбинантной карбоксиангидразы контролировали по восстановлению эстеразной активности белка [18].

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 280 нм. Для карбоксиангидразы Б и ее мутантных форм коэффициент экстинкции был принят равным $A_{1\text{ см}}^{0,1\%} = 1,87$ [14,15].

Окисление SS-связей проводили следующим образом. Лиофильно высушенные белки ресуспендировали до концентрации 3 мг/мл в 0,2 M трис-HCl-буфере, pH 8,8, содержащего 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA, а также 10 mM окисленного и 2 mM восстановленного глутатиона. Процесс окисления протекал при 25°C в течение 24 ч. Полноту окисления SH-групп контролировали при помощи реагента Элмана (5,5'-дитиобис(2-нитробензоат)) [19].

Микрокалориметрические эксперименты проводили на дифференциальном сканирующем микрокалориметре SCAL-1 (ООО «Скал», Россия) со стеклянной ячейкой объемом 0,33 мл при различных скоростях сканирования (0,125, 0,25, 0,5, 1,0 и 2,0 К/мин) [20]. Измерения проводили под давлением 2 атм. Сбор данных осуществлялся автоматически с шагом температуры 0,1 К. Для записи данных использовали программу Wscal, разработанную в лаборатории термодинамики белка Института белка РАН (Пушино, Московская обл.). Концентрация белков в микрокалориметрических экспериментах составляла 1 мг/мл в буфере, содержащем 20 мМ фосфата натрия, pH 8,0. Для получения значений парциальной теплоемкости белка использовалась программа SCAL, основанная на алгоритмах, описанных в работе [21]. Для получения кривых избыточной теплоемкости проводили линейную экстраполяцию теплоемкостей нативного и денатурированного состояний белка в область денатурационного пе-

рехода и вычитали их из значений парциальной теплоемкости белка, используя «сигмоидальную» базовую линию, как описано в работе [21]. Для всех расчетов принимали значение парциального объема белка равным 0,73 см³/г.

Определение констант скоростей тепловой денатурации из данных ДСК. Кривые плавления анализировали с использованием модели денатурации, включающей две последовательно протекающие необратимые стадии [22].



где N , I , D – нативное, промежуточное и денатурированное состояния белка соответственно; k_i – константы скоростей разворачивания белка.

В рамках этой модели форма кривой зависимости избыточной теплоемкости белка C_p^{ex} от температуры T описывается следующей формулой [23]:

$$C_p^{ex} = \frac{\Delta H_1 k_1}{v} \exp\left(-\frac{1}{v} \int_{T_0}^T k_1 dT\right) + \frac{\Delta H_2 k_2}{v} \exp\left(-\frac{1}{v} \int_{T_0}^T k_2 dT\right) \times \int_{T_0}^T \left[k_1 \exp\left(\frac{1}{v} \int_{T_0}^T (k_2 - k_1) dT\right) \right] dT. \quad (2)$$

При этом скорости для первой и для второй стадии денатурации (k_1 и k_2) определяются как

$$k_1 = \exp[-\Delta E_1^\# / R (1/T - 1/T_1^*)] \quad (3)$$

$$\text{и } k_2 = \exp[-\Delta E_2^\# / R (1/T - 1/T_2^*)],$$

где ΔH_1 и ΔH_2 – молярные изменения энтальпии, $\Delta E_1^\#$ и $\Delta E_2^\#$ – энергии активации, T_1^* и T_2^* – температурные параметры для первой и второй стадий денатурации соответственно, v – скорость прогрева. Таким образом, после выполнения минимизации расхождения между экспериментальной и модельной кривыми можно рассчитать значения энергий активации ΔT_1^* и ΔT_2^* и температурных параметров T_1^* и T_2^* . Зная энергии активации и температурные параметры, мы можем построить зависимость логарифма констант скоростей $\ln(k_1)$ и $\ln(k_2)$ от обратной температуры ($1/T$). Наклон таких зависимостей определяется энергиями активации $\Delta E_1^\#$ и $\Delta E_2^\#$, а сдвиг – температурными параметрами T_1^* и T_2^* . Для подгонки теоретических кривых к экспериментальным использовали программу IGORpro (WaveMetrics Inc, США).

Измерение кинетики тепловой денатурации методом флуоресценции. Температурный скачок

при измерении кинетик тепловой денатурации карбоксиангидразы Б осуществлялся в режиме ручного смешивания при добавлении холодного раствора белка (20 мкл, 20°C) в буфер, разогретый до температуры, при которой проводился кинетический эксперимент (2 мл, 70–80°C). Буфер находился в термостатированной кювете спектрофлуориметра. Конечная концентрация белка в кювете составляла 0,1 мг/мл.

Кинетики тепловой денатурации измеряли методом триптофановой флуоресценции (возбуждение 280 нм, испускание 335 нм). Кривые зависимости интенсивности флуоресценции от времени аппроксимировали следующим уравнением:

$$I = A \cdot \exp(-k_1 t) + B \cdot \exp(-k_2 t) + D,$$

где I – интенсивность флуоресценции; t – время; A , B , C , D , k_1 , k_2 , k_3 – параметры аппроксимации.

Расчет контактов между аминокислотными остатками. Расчет контактов аминокислотных остатков в белках выполняли с помощью программы, написанной Б.С. Мельником на языке программирования C++. Программа анализирует файл из банка белковых структур (PDB), в котором записаны координаты атомов белка. Для определения, контактируют или нет два аминокислотных остатка, использовали следующую

ший критерий: если есть хотя бы одна пара атомов в разных аминокислотных остатках, расстояние между которыми меньше расстояния D , то аминокислотные остатки считались контактирующими. Расстояние D в большинстве расчетов принималось равным 6 Å.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мутационный подход для определения последовательности сворачивания/разворачивания структурных элементов белка (μ -анализ). Влияние SS-мостиков и замены гидрофобных аминокислотных остатков с большим количеством контактов на разворачивание белка с несколькими промежуточными состояниями. Попытаемся понять, как замены гидрофобных аминокислотных остатков с большим количеством контактов и SS-мостики повлияют на энергетический ландшафт белка, разворачивание которого происходит последовательно в нескольких стадий.

На рис. 1 схематично изображены последовательности состояний при разворачивании белка с двумя промежуточными состояниями и взаимное расположение энергетических уровней такого белка. Рассмотрим сначала, какие изменения можно ожидать в энергетических уровнях многостадийного белка, если мы делаем замены одиночных гидрофобных аминокислотных остатков с большим количеством контактов. Такие мутации должны повлиять в основном на плотно упакованные состояния. Предположим, что мы заменили остаток, находящийся в структурном элементе белка, который формируется на самой последней стадии сворачивания и при денатурации белка разрушается соответственно самым первым (рис. 1а). Очевидно, что такая замена дестабилизирует только нативное состояние белка и никак не повлияет на остальные, поскольку уже после первого этапа разворачивания этот аминокислотный остаток находится в «разрушенной», не структурированной части белка. На энергетической схеме видно, что такая мутация должна повлиять только на скорость разворачивания нативного состояния (k_1). Напротив, если замененный остаток стабилизирует структурный элемент, который разворачивается последним (сворачивается первым), то такая мутация должна повлиять на все стабильные состояния белка, как это показано на рис. 1б. Поскольку каждое следующее (при сворачивании) состояние белка включает в себя предыдущее, то такая замена приведет к изменению всех скоростей разворачивания (рис. 1б). Таким образом, чем позже (ближе к нативному состоянию) структурируется часть белка, в которой сделана мутация, тем на меньшее количество состояний

мы повлияем такой мутацией (рис. 1а). И наоборот, чем раньше при сворачивании структурируется элемент, в котором сделана мутация (ближе к развернутому состоянию), тем на большее количество состояний «подействует» такая мутация (рис. 1б).

На рис. 1 также показано, как подействует на белок введение цистеинового мостика (SS-связи) в случаях, когда он «скрепляет» структурный элемент белка, который сворачивается последним (рис. 1в) или первым (рис. 1г). Видно, что введение SS-связи должно повлиять на разные этапы разворачивания белка противоположным образом по сравнению с одиночными мутациями. То есть если мы «скрепили» SS-связью структуру, которая разворачивается последней (сворачивается первой), то мы повлияем только на один, последний этап разворачивания (рис. 1г). Если же мы «закрепили» структурный элемент, который разворачивается первым (сворачивается последним), то очевидно, что такая мутация изменит весь путь разворачивания (рис. 1в), поскольку «заставит» нестабильный структурный элемент сохранять компактную конформацию на всех этапах разворачивания. Следует подчеркнуть, что на рис. 1 сложно изобразить все нюансы взаимного влияния различных энергетических уровней белка. Цель этого рисунка исключительно в том, чтобы схематично показать основные результаты, которые можно ожидать при исследовании влияния вышеописанных мутаций на энергетический ландшафт белка.

Кроме того, напрашивается еще один очень важный вывод. Отдельно каждый из видов мутаций (одиночные замены гидрофобных аминокислотных остатков или введение SS-связей) не позволяет проанализировать путь сворачивания многостадийных белков. Необходимо в выбранном структурном элементе белка исследовать два вида мутаций, рассмотренных выше, т.е. необходимо провести мультимутационный анализ многостадийно сворачивающихся белков. Для краткости мы назвали такой подход μ -анализом.

Как следует выбирать мутации для μ -анализа? Из изложенных выше рассуждений следует, что для одиночных замен следует выбирать гидрофобные аминокислотные остатки с максимально возможным количеством контактов. Такие мутации в большей степени должны подействовать на стабильные плотно упакованные состояния и в меньшей степени на переходные. В противоположность этому для SS-мостиков следует выбирать аминокислотные остатки, расположенные на поверхности белка, чтобы не нарушить гидрофобные контакты. Такие мутации в большей степени должны повлиять на переходные состояния и в меньшей

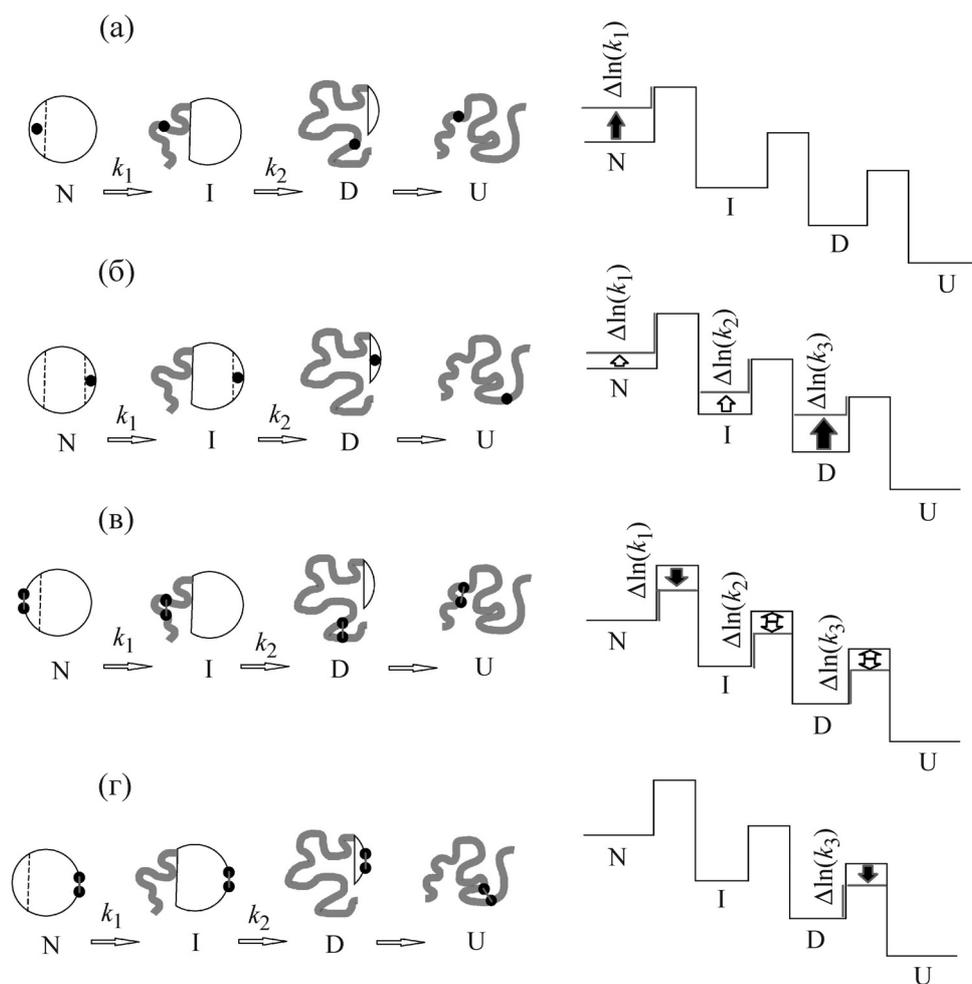


Рис. 1. Схематичное изображение последовательности состояний при разворачивании белка (слева) и взаимное расположение энергетических уровней (справа) этого белка. N, I₁, I₂, D – нативное, промежуточные и денатурированное состояния соответственно. Замененные аминокислотные остатки (мутации) изображены черными кружочками. (а) – Одиночная замена гидрофобной аминокислоты в структурном элементе, который разворачивается первым, повлияет только на нативное состояние белка. При этом дестабилизация (увеличение свободной энергии) нативного состояния повлияет на константу разворачивания первой стадии (k_1). (б) – Одиночная замена гидрофобной аминокислоты в структурном элементе, который разворачивается последним, повлияет на скорости разворачивания всех стадий, поскольку изменит стабильность всех состояний белка. (в) – SS-мостик в структурированной части состояния N, он влияет на все этапы разворачивания, поскольку «заставляет» быть компактной часть белка, которая должна была развернуться на первой стадии. (г) – SS-мостик (два черных кружочка на рисунке) в структурированной части состояния I₂, он повлияет только на самый последний этап разворачивания, поскольку не влияет на подвижность и стабильность состояний N и I₁. В этих схемах предполагается, что мы ввели идеальную SS-связь, которая не нарушила внутреннюю упаковку белка. На энергетических схемах в правой части рисунка преднамеренно допущена неточность. На самом деле, если мутация повлияла на стабильность промежуточного состояния (например I₁ на рис. (б)), то это должно изменить свободную энергию переходного состояния между состояниями N и I₁ и нативного состояния. Если соблюдать эти правила, то рисунок окажется сложным и неинформативным. Поэтому схемы в правой части рисунка показаны так, если бы каждый из этапов разворачивания белка проходил совершенно независимо от других.

степени на стабильные, плотно упакованные. Кроме того, SS-мостики нужно выбирать так, чтобы они «перешивали» полипептидную цепь внутри небольшого структурного элемента, который вероятнее всего формируется на одном из этапов сворачивания. Если «сшить» между собой разные структурные элементы, то мы изменим весь путь сворачивания и не получим необходимую нам информацию. Одиночную за-

мену и SS-мостик желательно проектировать рядом – это даст возможность анализировать воздействие двух разных видов мутаций на один и тот же структурный элемент белка.

Таким образом, исследование двух видов мутантных форм белка (SS-мостики и замена гидрофобных аминокислотных остатков с большим количеством контактов) позволит нам по-

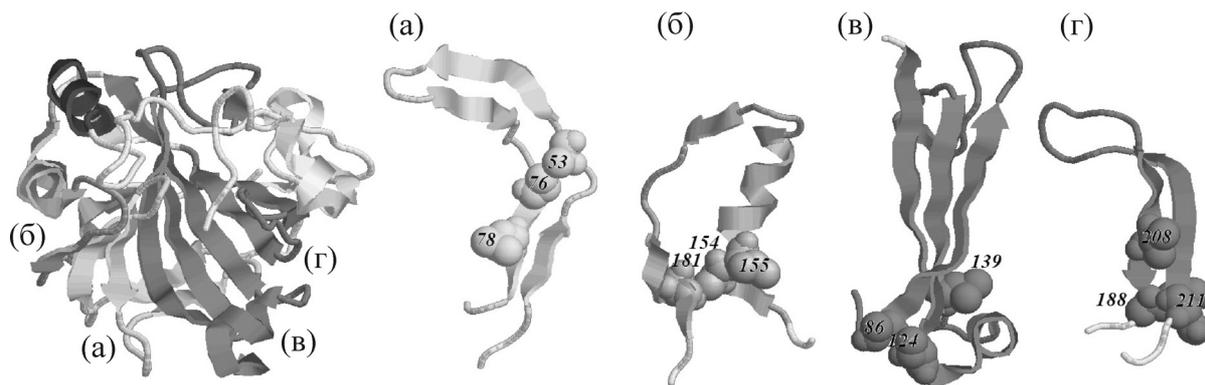


Рис. 2. Объемная модель карбоксиангидразы Б (структура 1V9E из PDB банка белковых структур). Отдельно показаны четыре структурных элемента – две β -шпильки (а,г), $\alpha\beta$ -шпилька (б) и β -лист (в). Объемными показаны аминокислотные остатки, которые были заменены на аланин (L78, L139, L155, I208 и Y6, M239) и контактирующие пары аминокислотных остатков, которые были заменены на цистеины (A53 и A76, A154 и S181, D188 и K211, T86 и T124).

нять последовательность формирования/разрушения разных структурных частей белка при его сворачивании/разворачивании. Попытаемся воспользоваться вышеизложенным подходом для исследования карбоксиангидразы Б.

Определение последовательности разворачивания структурных элементов карбоксиангидразы Б с использованием μ -анализа. Выбор мутаций в карбоксиангидразе Б. На рис. 2 показана структура белка карбоксиангидразы Б (структура 1V9E из PDB-банка). Разные структурные элементы этого белка выделены разными оттенками серого цвета. Структурных элементов, которые можно исследовать с помощью μ -анализа, – только четыре. Эти элементы показаны отдельно на рис. 2а–г – это две β -шпильки, один β -лист (из трех β -стрендов) и $\alpha\beta$ -шпилька. Только в этих элементах можно сделать как одиночные замены аминокислотных остатков, так и спроектировать цистеиновые мостики, скрепляющие выбранные структурные элементы. Таким образом, в карбоксиангидразе Б осталось совсем немного структурных элементов, которые невозможно «укрепить» SS-связью, не затрагивая других структурных элементов – это одна α -спираль и несколько петель на N- и C-концах белка (показаны на рис. 2).

На рис. 3 показана диаграмма – количество остаток-остаточных контактов каждого аминокислотного остатка карбоксиангидразы Б. Линии внизу диаграммы показывают положение выбранных структурных элементов в белке. В четырех структурных элементах карбоксиангидразы Б (рис. 2а–г) мы выбрали по одному гидрофобному остатку с большим количеством контактов для замены его на аланин и пары контактирующих остатков для замены их на цистеины, которые смогут образовать SS-мостик. Для одиночных мутаций были выбраны

следующие остатки: L78, L139, L155 и I208. Пары остатков для замены на цистеины выбирали с использованием трех критериев. Во-первых, взаимное положение и ориентация этих аминокислотных остатков должны быть такими, чтобы при замене их на цистеины могла завязаться SS-связь. Во-вторых, они должны быть расположены как можно ближе к остаткам, которые были выбраны для замены на аланин. В-третьих, SS-связь должна «скреплять» концы β -шпильки. Все вышесказанное достаточно наглядно видно на рис. 3. Таким образом, для введения SS-связей были выбраны следующие пары аминокислот: A53 и A76, A154 и S181, D188 и K211, T86 и T124. На рис. 2 показано положение всех выбранных для замен аминокислотных остатков.

Исследование мутантных форм карбоксиангидразы Б. Карбоксиангидраза Б дикого типа и ее мутантные формы были исследованы методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии. На рис. 4 показаны температурные зависимости избыточной теплоемкости карбоксиангидразы дикого типа и ее мутантных форм. Видно, что при разной скорости сканирования положение и форма пиков плавления меняется. Такие изменения говорят о том, что процесс тепловой денатурации карбоксиангидразы проходит неравновесно. Однако по внешнему виду этих пиков невозможно определить, о каком количестве стадий разворачивания они содержат информацию. Поскольку из данных, полученных ранее спектральными методами, было известно, что процесс денатурации карбоксиангидразы проходит как минимум в три стадии, две из которых относительно медленные [16,17], то полученные температурные зависимости избыточной теплоемкости карбоксиангидразы Б мы аппроксимировали моделью,

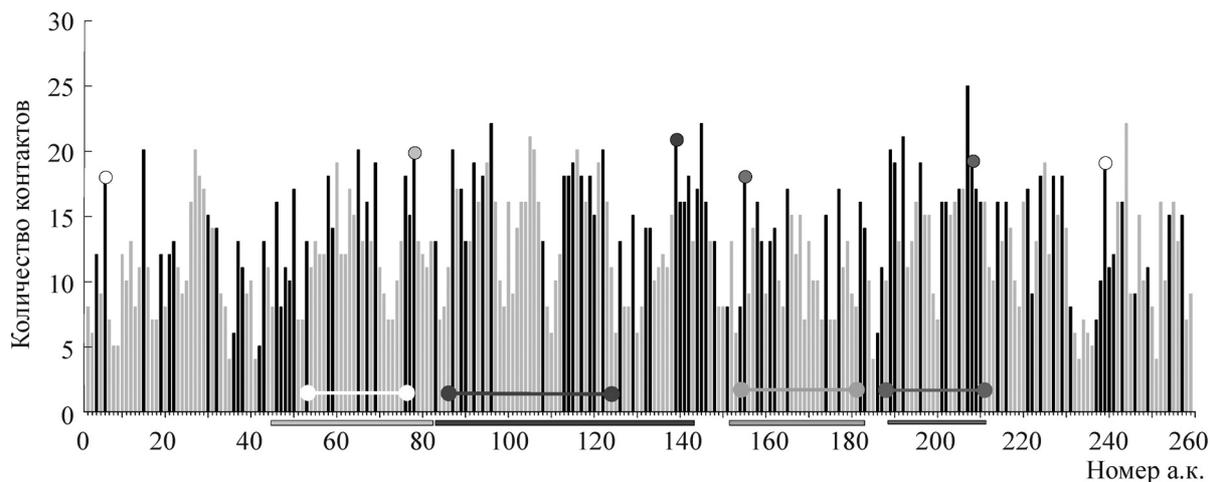


Рис. 3. Количество остаток-остаточных контактов каждого аминокислотного остатка (расстояние контакта 6 Å). Темными столбцами выделены гидрофобные аминокислоты. Линии внизу графика показывают положение структурных элементов, обозначенных на рис. 2 как (а), (б), (в) и (г). Кружочками на графике отмечены столбцы, относящиеся к аминокислотам, замененным на аланин, кружочками, соединенными линией, внизу графика, отмечены пары аминокислот, замененные на цистеины.

включающей две последовательно протекающие стадии необратимой денатурации (уравнения (1–2) и (3)). Как видно из рис. 4, двухстадийная модель прекрасно описывает экспериментальные данные. Это позволило нам построить графики Аррениуса – зависимости логарифмов двух констант скоростей тепловой денатурации от обратной температуры для карбоксиангидразы дикого типа и ее мутантных форм (рис. 5).

Чтобы убедиться, что константы скоростей, полученные по данным дифференциальной сканирующей микрокалориметрии, действительно относятся к фазам теплового разворачивания карбоксиангидразы Б, мы провели прямой кинетический эксперимент. Кинетические кривые температурного разворачивания карбоксиангидразы измеряли методом триптофановой флуоресценции. Зависимости интенсивности флуоресценции белка от времени при заданной температуре аппроксимировали экспоненциальными функциями (суммой двух экспонент), которые позволяли определить константы скоростей двух стадий температурного разворачивания карбоксиангидразы. Таким образом, мы получили зависимость двух констант скоростей разворачивания карбоксиангидразы от температуры в диапазоне температур от 72 до 82°C. На рис. 6 показаны логарифмы констант скоростей разворачивания карбоксиангидразы при разных температурах, рассчитанные из прямых кинетических экспериментов, и зависимости, построенные по данным дифференциальной сканирующей микрокалориметрии. Видно, что зависимости, полученные с помощью сканирующей микрокалориметрии, хорошо совпадают

с результатами прямых кинетических экспериментов.

Вернемся к рис. 5, на котором представлены графики Аррениуса для карбоксиангидразы Б дикого типа, мутантных форм с одиночными заменами и мутантных форм с введенными цистеиновыми мостиками. Какие выводы можно сделать из этого рисунка? Еще раз напомним, что структурные элементы, на которые была «разбита» карбоксиангидраза Б и в которых были введены два вида замен, отличаются друг от друга не только по структуре, но и по степени погруженности в гидрофобное ядро белка. Поэтому попытаемся проанализировать исключительно качественные изменения скоростей разворачивания карбоксиангидразы Б. Так, например, из рис. 5 видно, что введенные SS-мостики 188C-211C и 86C-124C слабо повлияли на обе скорости разворачивания карбоксиангидразы Б. При этом введенные SS-связи 53C-76C и 154C-181C существенно изменили константы скоростей k_1 и k_2 . Вспомнив рассуждения, проиллюстрированные на рис. 1, можно предположить, что структурные элементы, показанные на рис. 2а и 2б, разворачиваются на первых стадиях денатурации карбоксиангидразы Б, поэтому SS-мостики в этих структурных элементах влияют на константы скоростей k_1 и k_2 , а структурные элементы показанные на рис. 2в и 2г, по-видимому, разворачиваются самыми последними, поэтому SS-мостики не влияют на скорости первого и второго этапов разворачивания карбоксиангидразы Б.

Как проанализировать влияние одиночных замен гидрофобных аминокислотных остатков на константы скоростей карбоксиангидразы? К

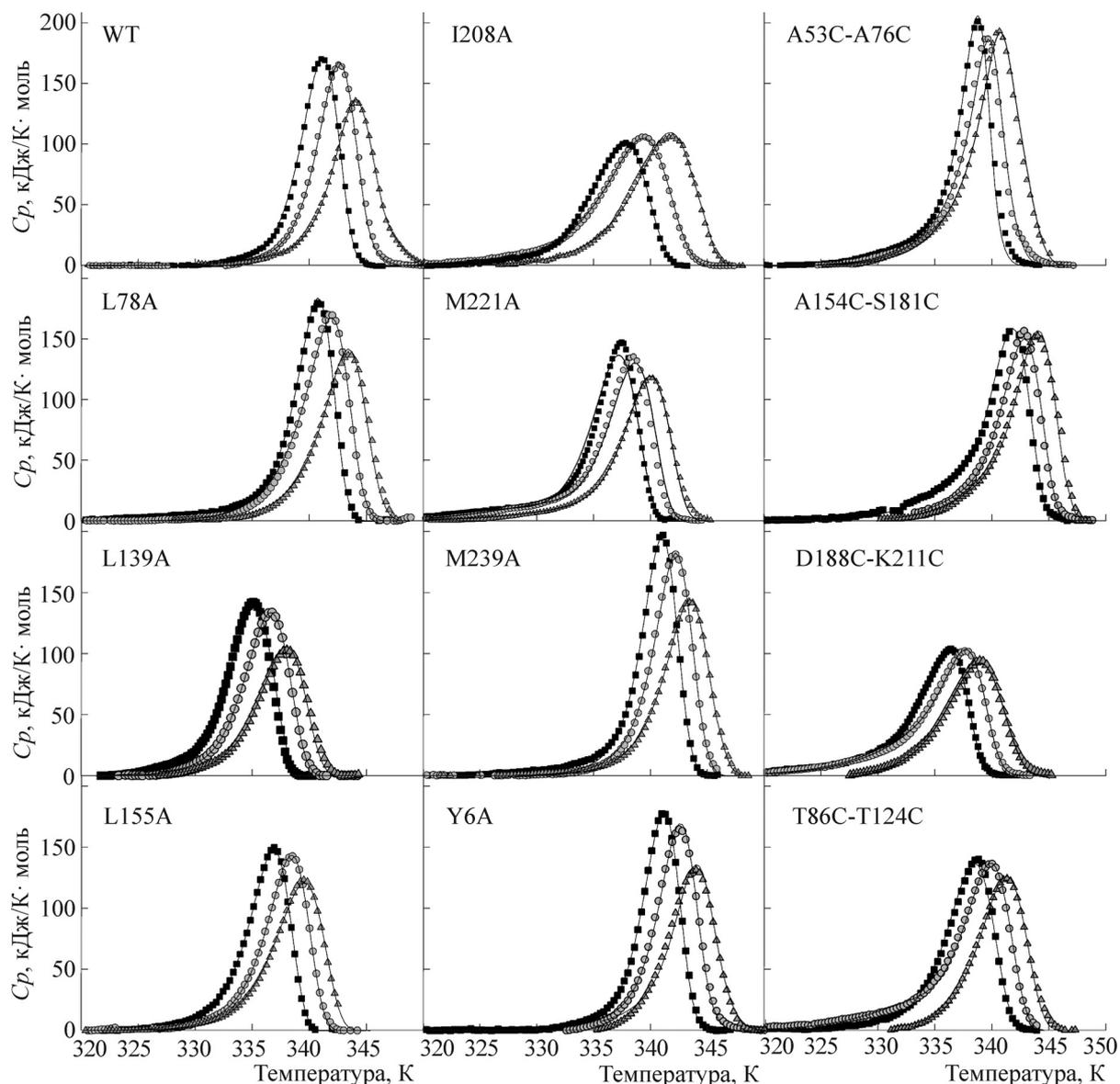


Рис. 4. Зависимости избыточной молярной теплоемкости от температуры для карбоксиангидразы Б и ее мутантных форм: с одиночными заменами аминокислотных остатков и с введенной SS-связью (двойные замены), измеренные при трех скоростях сканирования (1,0 К/мин – квадраты, 0,5 К/мин – кружки, 0,25 К/мин – треугольники) в 20 мМ фосфатном буфере, рН 8,2. Символами показаны экспериментальные данные, линиями – рассчитанные с использованием двухстадийной модели денатурации (I).

сожалению, сделать это достаточно сложно. Все одиночные замены повлияли и на первую и на вторую константу скорости разворачивания, за исключением замены L78A, которая слабо повлияла на скорости разворачивания карбоксиангидразы. Такое слабое влияние сложно проанализировать. Складывается впечатление, что одиночные замены L78A, L139A, L155A и I208A затрагивают и первую, и вторую стадии разворачивания, т. е. входят в структурированную часть как второго, так и более поздних (при разворачивании) промежуточных состояний. Какая же часть белка разрушается первой? Мы

предположили, что это могут быть те части карбоксиангидразы, которые мы не исследовали введением SS-мостиков и четырьмя одиночными заменами аминокислот L78A, L139A, L155A, I208A. Чтобы это проверить, мы сделали замены двух гидрофобных аминокислотных остатков на N- и C-концах карбоксиангидразы Б – это остатки M239 и Y6. Мутантные формы карбоксиангидразы M239A и Y6A также были исследованы методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии при трех скоростях прогрева. Из полученных кривых плавления были рассчитаны константы скоростей

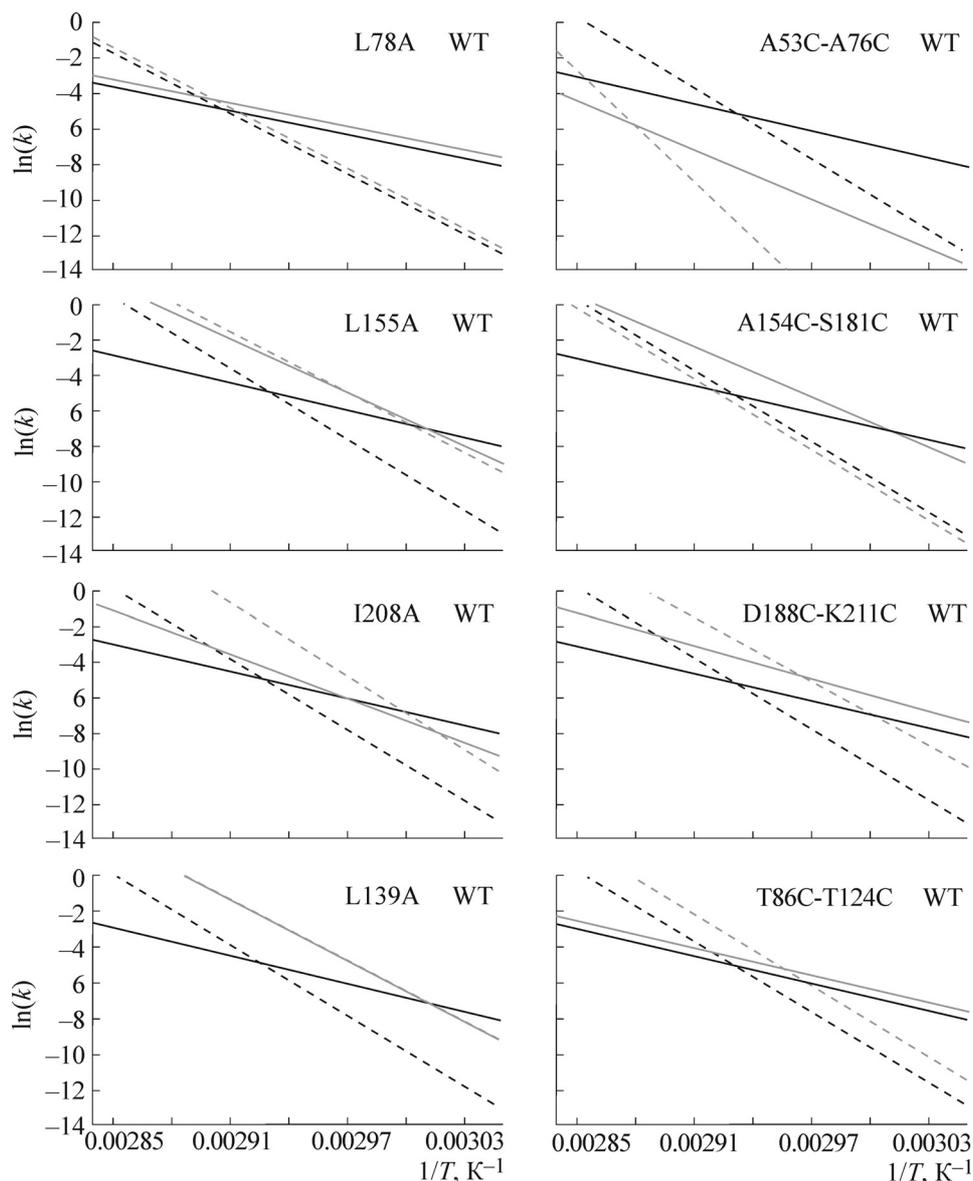


Рис. 5. Графики Аррениуса – зависимости логарифмов медленных констант скоростей разворачивания карбоксиангидразы от обратной температуры для белка дикого типа (черным цветом) и его мутантных форм (серым цветом) с заменами гидрофобных аминокислот (графики слева) и с введенными SS-связями (графики справа). Зависимости получены из аппроксимации пиков плавления уравнением (2). Для замены L139A аппроксимация выполнена по модели одностадийного разворачивания.

первой и второй стадий разворачивания. На рис. 7 показаны графики зависимости логарифмов констант скоростей от обратной температуры для этих мутантных форм карбоксиангидразы. Видно, что обе мутантные формы белка сильно повлияли на константу скорости k_1 и практически не повлияли на константу скорости k_2 . Такое влияние сопоставимо с влиянием, предсказанным теоретически и изображенным на рис. 1а, т.е. случаем, когда одиночная замена аминокислотного остатка затрагивает ту часть белка, которая структурирована только в нативном состоянии, а в промежуточ-

ных состояниях – не структурирована. Следовательно, можно предположить, что участки полипептидной цепи карбоксиангидразы Б, в которых сделаны мутации M239A и Y6A, разворачиваются самыми первыми.

Таким образом, одиночные замены аминокислотных остатков позволили найти структурные части карбоксиангидразы, разворачивающиеся первыми, – это N- и C-концевые участки полипептидной цепи данного белка. Введение SS-связей позволило выявить, что β -стренды в районе аминокислот 86–124 и 188–211 развора-

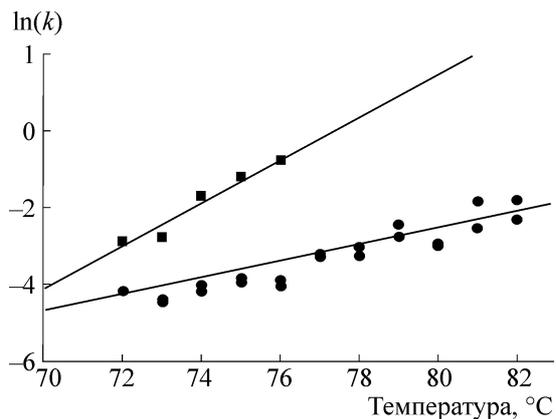


Рис. 6. Графики Аррениуса – зависимости логарифма констант скоростей разворачивания карбоксиангидразы Б от обратной температуры при pH 8,2. Константы скоростей, полученные методом флуоресценции, показаны символами. Константы скоростей, полученные из данных дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (рис. 4), показаны линиями.

чиваются самыми последними, а разворачивание структурных элементов в районе аминокислот 53–76 и 154–181 затрагивает первую и вторую стадии разворачивания. Все это позволяет предположить схему разворачивания карбоксиангидразы, представленную на рис. 8.

ВЫВОДЫ

Метод, названный нами μ -анализом, позволил соотнести разные стадии разворачивания карбоксиангидразы Б с разрушением конкретных структурных элементов этого белка. Для получения такого результата выполнено исследование мутантных форм белка с одиночными заменами гидрофобных аминокислотных остатков и введенными на поверхности белка цистеиновыми мостиками. Температурное разворачивание карбоксиангидразы Б дикого типа и десяти ее мутантных форм исследовано методом дифференциальной сканирующей микро-

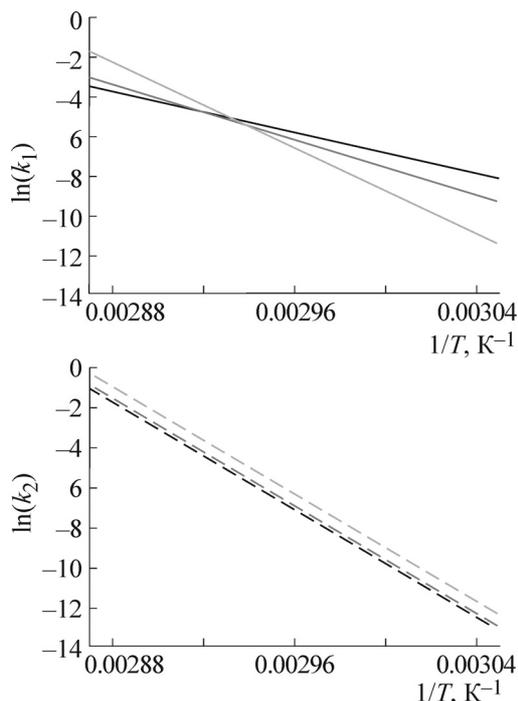


Рис. 7. Графики Аррениуса – зависимости логарифмов медленных констант скоростей разворачивания карбоксиангидразы Б от обратной температуры для белка дикого типа (черная линия) и его мутантных форм с заменами M239A (светло-серая линия) и Y6A (темно-серая линия); pH 8,2.

калориметрии. Из кривых неравновесного плавления всех мутантных форм рассчитаны константы скоростей двух этапов денатурации. Анализ влияния мутаций на константы скоростей позволил определить последовательность разрушения структурных элементов карбоксиангидразы Б при ее денатурации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-00925). Калориметрические исследования карбоксиангидразы Б проведены при финансовой поддержке

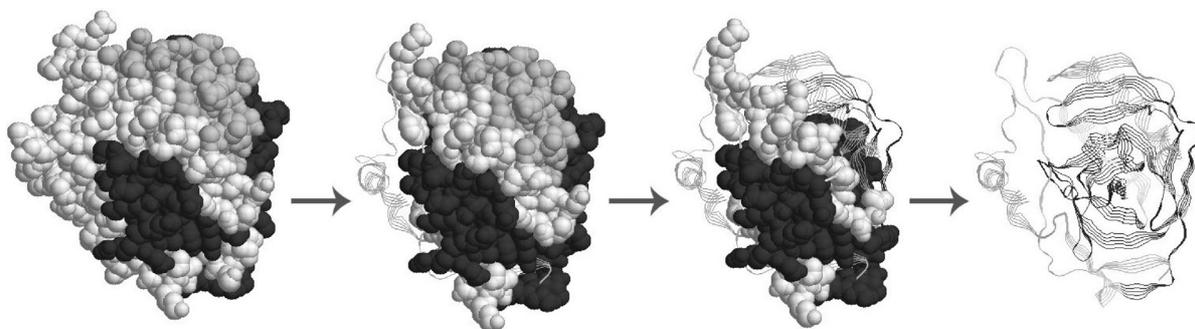


Рис. 8. Предположительные этапы разворачивания карбоксиангидразы Б по результатам μ -анализа. Для разных состояний белка объемными показаны части, которые остаются структурированными, тонкими линиями – развернутые или денатурированные участки.

Российского научного фонда (грант №14-24-00157).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. В. Финкельштейн и О. Б. Птицын, *Физика белка: Курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами* (КДУ, М., 2005).
2. A. R. Fersht, L. S. Itzhaki, N. F. El Masry, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10426 (1994).
3. A. Matouschek and A. R. Fersht, in *Methods Enzymology*, Ed. by J. J. Langone (Acad. Press, New York, 1991), pp. 82–112.
4. A. R. Fersht, A. Matouschek, and L. Serrano, *J. Mol. Biol.* **224**, 771 (1992).
5. A. Matouschek, J. T. Kellis, Jr., L. Serrano, et al., *Nature* **346**, 440 (1990).
6. M. J. Parker, J. Spencer, and A. R. Clarke, *J. Mol. Biol.* **253**, 771 (1995).
7. T. N. Melnik, T. V. Povarnitsyna, A. S. Glukhov, and B. S. Melnik, *PLoS One* **7** (11), e48604 (2012).
8. J. Clarke and A. R. Fersht, *Biochemistry* **32**, 4322 (1993).
9. V. Ramakrishnan, S. P. Srinivasan, S. M. Salem, et al., *Proteins* **80**, 920 (2012).
10. J. Mansfeld, G. Vriend, B. V. Van den Burg, et al., *Biochemistry* **38**, 8240 (1999).
11. V. S. Dani, C. Ramakrishnan, and R. Varadarajan, *Prot. Eng.* **16**, 187 (2003).
12. I. Sanchez-Romero, A. Ariza, K. S. Wilson, et al., *PLoS One* **8**, e70013 (2013).
13. B. S. Melnik, G. S. Nagibina, A. S. Glukhov, et al., *Biochim. Biophys. Acta* (2016) (в печати). <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.09.006>.
14. G. V. Semisotnov, N. A. Rodionova, V. P. Kutysenko, et al., *FEBS Lett.* **224**, 9 (1987).
15. G. V. Semisotnov, V. N. Uversky, I. V. Sokolovsky, et al., *J. Mol. Biol.* **213**, 561 (1990).
16. Б. С. Мельник, В. В. Марченков, С. Р. Евдокимов и др., *Вестн. СПбГУ, сер. 4* (1), 10 (2007).
17. B. S. Melnik, V. V. Marchenkov, S. R. Evdokimov, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369** (2), 701 (2008).
18. J. M. Armstrong, D. V. Myers, J. A. Verproorte, and J. T. Edsall, *J. Biol. Chem.* **241**, 5137 (1966).
19. Ю. М. Торчинский, *Сера в белках* (Наука, М., 1977).
20. A. A. Senin, S. A. Potekhin, E. I. Tiktopulo, and V. V. Filomonov, *J. Therm. Anal. Cal.* **62**, 153 (2000).
21. P. L. Privalov and S. A. Potekhin, in *Methods in Enzymology*, Ed. by C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff (Acad. Press, Orlando, San Diego, New York, Austin, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 1986), **131**, pp. 1–51.
22. А. Е. Любарев и Б. И. Курганов, *Успехи биол. химии* **40**, 43 (2000).
23. А. Е. Любарев и Б. И. Курганов, *Биохимия* **63**, 516 (1998).

An Approach Allowing the Determination of the Sequence of Destruction of Protein Structural Elements upon Protein Unfolding. Studies of Carboxyanhydrase B

B.S. Melnik, G.S. Nagibina, A.S. Glukhov, and T.N. Melnik

*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 4, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The experimental approach called the μ -analysis was used in the study. It allowed us to understand the sequence of destruction of structural elements of protein upon its denaturation. This approach can be used for studying proteins, the folding/unfolding of which proceeds in several stages via formation/destruction of several intermediate states. It consists in systematic examination of mutant forms of the protein with single substitutions of hydrophobic amino acid residues and with inserted cysteine bridges. The substituted amino acid residues should, herewith, be in the same structural elements of the protein. Generally, due to single substitutions of hydrophobic amino acid residues it is possible to obtain information on structural elements of proteins, destructed during the final stages of protein denaturation. Insertion of cysteine bridges on the protein surface makes it possible to study protein structural elements which unfold first upon protein denaturation. Our calorimetric studies of nonequilibrium melting of bovine carboxyanhydrase B provided information on rate constants of unfolding of ten mutant forms of this protein. The analysis of the effect of mutations on the rate of different stages of protein unfolding permitted us to determine the sequence of destruction of structural elements of carboxyanhydrase B upon thermal denaturation.

Key words: protein folding, protein denaturation, kinetics, mutation analysis, introduction of SS bonds, carboxyanhydrase B