

УДК 577.4

## ПЕРЕХОДНЫЕ СОСТОЯНИЯ ЛЕГГЕМОГЛОБИНА И ДРУГИХ ГЕМОПРОТЕИНОВ ПРИ ИХ ДЕНАТУРАЦИИ

© 2015 Пиджш Басак<sup>1</sup>, Нилой Кунду<sup>2</sup>,  
Рудради Паттанаяк<sup>1</sup>, Майтри Бхаттачария<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Университет Калькутты, кафедра биохимии, Индия, 700019 Колката;  
факс: +91(33)246-14849, электронная почта: [bmaitree@gmail.com](mailto:bmaitree@gmail.com)

<sup>2</sup> Индийский институт технологий, химический факультет, Индия,  
721302 Харагпур; факс: +91(32)22-282252

Поступила в редакцию 25.09.14

После доработки 20.11.14

Проведено исследование переходных состояний при разворачивании мономерных белков леггемоглобина, миоглобина и цитохрома *c* с помощью спектрофотометрии в УФ-видимой области спектра, измерения стационарной флуоресценции и флуоресценции с разрешенным временем. Конформационная стабильность нативного «свернутого» состояния белков и их «развернутых» состояний были исследованы с точки зрения модели двух переходных состояний. Значения  $\Delta G_D$  (298° К) при двух переходных состояниях получены при денатурации хаотропными агентами (мочевинной и гуанидин-гидрохлоридом, Gdn-HCl). Значения свободной энергии леггемоглобина во время денатурации было ниже в сравнении с цитохромом *c* и миоглобином. Значение *m* было наименьшим для леггемоглобина, в сравнении с цитохромом *c* и миоглобином. Значение *m* (мера зависимости  $\Delta G_D$  от концентрации денатурирующего агента) для цитохрома *c* и миоглобина ниже, чем в случае денатурации мочевиной по сравнению с гуанидин-гидрохлоридом. Максимум поглощения в УФ-видимой области спектра и максимумы эмиссии флуоресценции в стационарном состоянии резко сдвигались в красную область в присутствии определенных концентраций, как в случае миоглобина, так и леггемоглобина, однако в случае цитохрома *c* картина была иной. Полученные данные были проанализированы с использованием модели двух переходных состояний. Данные по продолжительности жизни указывают на наличие промежуточного состояния во время денатурации. Разворачивание белков может модулировать конформацию, стабильность и расположение на поверхности этих биологически активных белков.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** денатурация, гемопроtein, свободная энергия Гиббса, переходные состояния, хаотропный агент.

Высокая чувствительность остатка триптофана к его микроокружению является ценным свойством внутренней флуоресценции белков. Конформационные переходы, ассоциации субъединиц, связывание лигандов или денатурация и др. приводят к изменениям спектра эмиссии триптофана. Эти взаимодействия могут воздействовать на локальное окружение вокруг индольного кольца. По-видимому, только остаток триптофана чувствителен к тушению в результате столкновений из-за тенденции возбужденного состояния индольного кольца к донации электрона.

Разворачивание белковой молекулы может быть вызвано экстремальными значениями температуры, рН, высокими концентрациями хаотропных агентов и высоких значений давления. Более того, ограниченные конформационные

изменения во время разворачивания могут сопровождать связывание специфических лигандов с белком. Глобальное разворачивание белка из упорядоченного нативного состояния (*N*, обладающее узким диапазоном микросостояний) к неупорядоченному развернутому состоянию (*U*, обладающее широким диапазоном микросостояний и возможно приближающееся в определенных условиях к случайному flight coil), может дать основную термодинамическую характеристику стабильности белка. Изменение свободной энергии для перехода  $N \leftrightarrow U$  является основным термодинамическим параметром, который обеспечивает меру стабильности состояния *N* относительно состояния *U*. Несколько экспериментальных методов могут быть использованы для прослеживания за переходом в развернутое состояние, и флуоресцентная спектроскопия является одним из наиболее полезных и многосторонних методов. В этой связи

\* Адресат для корреспонденции.

представляют большой интерес денатурирующие агенты, воздействующие на вторичную и третичную структуру без влияния на первичную структуру. Наиболее часто для этих целей используются мочевины и гуанидин-гидрохлорид. Из-за высокого сродства к пептидным связям эти молекулы разрушают водородные связи и солевые мостики между положительно и отрицательно заряженными боковыми цепями аминокислотных остатков, нарушая третичную структуру пептидной цепи. При удалении денатурирующих агентов из раствора белка во многих случаях происходит восстановление нативной формы белка. Денатурация разрушает  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -складчатые структуры белков с образованием структур со случайной формой [1]. Обычно во время денатурации происходит осаждение или коагуляция белков, приводящие к образованию биологически неактивной молекулы [2].

Леггемоглобин (Lb—leghemoglobin) — это мономерный гемопротейн, структурно схожий с миоглобином, но при этом обладающий в десять раз большим сродством к кислороду. Леггемоглобин транспортирует кислород от мембраны центральных клеток клубня бобовых к симбиосомам, которые представляют собой мембрано-связанные внутриклеточные органеллы, в которых расположены бактериоиды — внутриклеточные азотфиксирующие формы бактерий рода *Rhizobium* [3]. Было обнаружено, что цитохром *c*, небольшой гем-содержащий белок, являющийся ключевым компонентом электрон-транспортной цепи, относительно слабо связан с внутренней мембраной митохондрий. Он способен подвергаться окислению и восстановлению, но при этом не связывает кислород. Цитохром *c* является высококонсервативным белком и встречается во многих видах растений, животных и одноклеточных организмах. Простетическая группа гема в цитохроме *c* прикреплена к глобиновой цепи посредством ковалентной связи. В этом случае связывание молекулы порфирина является более прочным по сравнению с миоглобином и леггемоглобином. Миоглобин связывает ионы железа и кислород и, в основном, обнаруживается в мышечной ткани у позвоночных и почти у всех млекопитающих. Этот белок состоит из восьми  $\alpha$ -спиралей и гидрофобного ядра, но не демонстрирует кооперативный характер связывания кислорода, как это делает гемоглобин. В миоглобине имеется проксимальный остаток гистидина, прикрепленный непосредственно к центральному атому железа, и дистальный остаток гистидина, расположенный на противоположном конце и не прикрепленный к атому железа. Таким образом, эти бел-

ки различаются по их биологическим функциям, несмотря на то, что все они содержат гем и обладают определенным сходством первичной структуры.

Наша работа посвящена изучению профиля денатурации этих трех гемопротейнов с использованием двух денатурирующих агентов, мочевины и гуанидин-гидрохлорида, для сравнения их поведения под воздействием хаотропных агентов. Были проведены измерения оптического поглощения и снижения стационарной и разрешенной во времени флуоресценции для исследования переходных состояний образующихся при разворачивании этих гемопротейнов [4–5].

Динамика белка и его конформация изменяются в ответ на изменения его окружения. Если микроокружение белка оказывает воздействие на силы взаимодействия, такие как Ван-дер-Ваальсовы силы, водородные, ионные и ковалентные связи, которые удерживают молекулу белка в определенной нативной конформации, то молекула белка может подвергнуться разворачиванию в результате разрушения этих связей. Хаотропные агенты, такие как мочевины и гуанидин-гидрохлорид (Gdn-HCl), являются органическими веществами, которые способны индуцировать разворачивание вследствие возрастания растворимости неполярных остатков белков [6]. Хотя механизм денатурации в результате использования этих агентов не совсем ясен, предполагается, что эти вещества взаимодействуют с пептидным остовом и разрушают водородные связи. Известно, что мочевины и Gdn-HCl различаются между собой: мочевины имеют нейтральный заряд и способны проникать в гидрофобные участки в белках, вызывая сольватацию неполярных групп, которые, как правило, не контактируют с растворителями. Молекула Gdn-HCl обладает положительным зарядом и в значительной степени влияет на ионную силу и pH раствора. Принято считать, что Gdn-HCl лучше подходит для разрушения поверхностных взаимодействий гидрофобных и гидрофильных аминокислотных остатков, увеличивая общую растворимость белка [7].

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Приготовление образцов белков.** Миоглобин и цитохром *c* были приобретены в «Sigma» (США). Леггемоглобин был выделен и очищен из корневых клубеньков *Arachis hypogea* согласно методу, описанному Басаком с соавт. [8].

**Измерение оптического поглощения.** Измерения стационарного оптического поглощения

нативного белка и денатурированного белка после двухчасовой инкубации осуществляли на двулучевом спектрофотометре Jasco V630.

**Измерения стационарной флуоресценции.** Изучение разворачивания проводили с использованием мочевины или Gdn-HCl. Белки инкубировали в присутствии различных концентраций денатурирующего вещества в течение 2 ч. Образцы белков возбуждали при длине волны 295 нм, при ширине волны 5 нм и измерения флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Hitachi F7000.

Большинство процессов денатурации протекает через двухэтапные механизмы. Кажущаяся константа равновесия  $K_D$  между денатурированным и нативным состоянием может быть подсчитана по следующей формуле [4]:

$$K_D = F - F_N / (F_D - F), \quad (1)$$

где  $F$  — это наблюдаемая интенсивность флуоресценции,  $F_N$  и  $F_D$  — величины интенсивности флуоресценции нативного и денатурированного белка соответственно.

Значения  $\Delta G_D$ , кажущейся свободной энергии процесса денатурации, получали по следующей формуле:

$$\Delta G_D = -RT \ln K_D. \quad (2)$$

Простой метод измерения конформационной стабильности в отсутствие денатурирующих агентов  $t\Delta G_{D,H20}$  основан на предположении, что линейная зависимость продолжается до нулевой концентрации и использованием метода наименьших квадратов для того, чтобы вставить полученные данные в следующее уравнение:

$$\Delta G_D = \Delta G_{D,H20} - m[D], \quad (3)$$

где  $m$  — мера зависимости  $\Delta G_D$  от концентрации денатурирующего вещества,  $\Delta G_{D,H20}$  — свободная энергия процесса разворачивания в отсутствие денатурирующего вещества,  $[D]$  — концентрация денатурирующего вещества.

Путем продолжения линейной вариации  $\Delta G_D$  с  $[D]$  до нулевой концентрации денатурирующего вещества были получены значения  $\Delta G_{D,H20}$ ,  $m$ , которые перечисляются ниже, в то время как средняя концентрация процесса разворачивания ( $C_M$ ) рассчитывалась с использованием следующего уравнения [9]:

$$C_M = \Delta G_{D(H20)} / m,$$

где  $m$  представляет наклон  $\Delta G_D$  против графика концентрации денатурирующего вещества.

**Измерение продолжительности жизни флуоресценции** проводили на приборе, обеспечивающем измерение время-скоррелированного подсчета фотонов (TCSPC — time correlated single photon counting), модель Fluoro Hub («Horiba Jobin Yvon», Великобритания). Образцы возбуждали при 295 нм, используя пульсирующий лазер NanoLED. Данные по падению эмиссии при 330 нм анализировали с использованием программного обеспечения DAS6.4, поставляемого вместе с оборудованием [11]. Параметры, такие как замена растворителя или конформационные изменения в белке, могут влиять на продолжительность жизни. В наших экспериментах белок (3 мкМ) инкубировали с 8М мочевины или 6М Gdn-HCl в течение 2 ч до начала определения продолжительности жизни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1, *a* и *b* представлены спектры поглощения миоглобина с мочевиной и гуанидин-гидрохлоридом соответственно; на рис. 1, *в* и *г* — спектры поглощения цитохрома *c* в присутствии мочевины и Gdn-HCl соответственно. Результаты определения оптического поглощения (рис. 1) указывают на частичное разворачивание белка в диапазоне концентраций 2–5 М в случае мочевины и 3–5 М для Gdn-HCl.

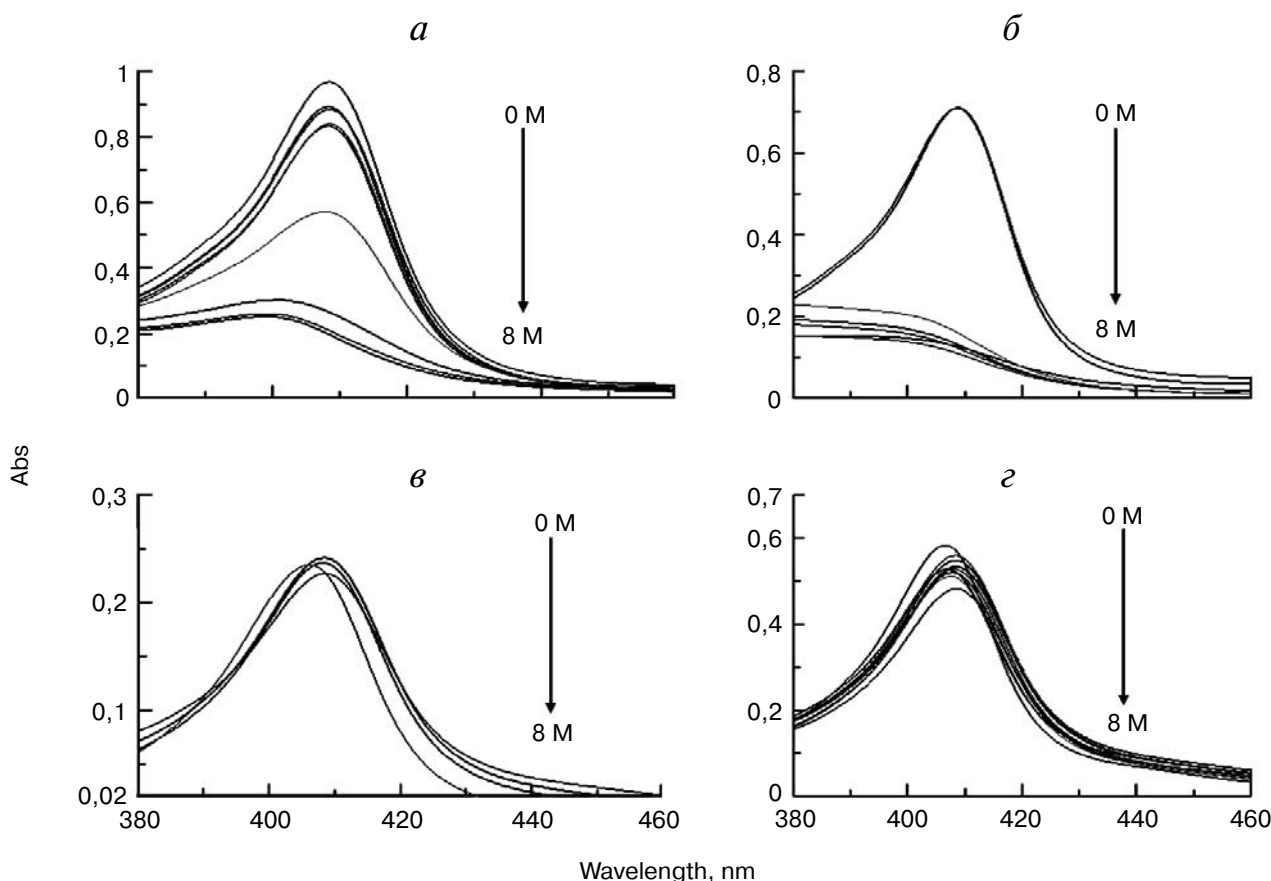
Для миоглобина и леггемоглобина показан сдвиг длины волны во время продленной экспозиции с высокими концентрациями денатурирующего вещества. В случае цитохрома *c* такой сдвиг не наблюдался. На спектрах поглощения в УФ-видимой части спектра положение  $\lambda_{\max}$  в случае миоглобина и леггемоглобина (не показано) резко сдвигалось в сторону более короткой длины волны (голубой сдвиг) после достижения определенной концентрации денатурирующего вещества, однако это не происходило в случае цитохрома *c* (рис. 1). В присутствии денатурирующего вещества сдвиг в голубую область спектра означает экспонирование конформации белка в полярное микроокружение в развернутом состоянии. Гем погружен в гидрофобный карман, внутри окружения гема в белке. При денатурации миоглобина и леггемоглобина наблюдалось снижение оптического поглощения, что говорит об экспонировании гема в полярный водный раствор [12–13]. В случае цитохрома *c* порфириновое кольцо связано ковалентно, что делает положение гема внутри глобиновой молекулы более прочным, в то время как у леггемоглобина и миоглобина гем связан с белковой частью нековалентными связями, которые легче подвергаются диссоциации. Так как

гем не диссоциирует из белковой части цитохрома *c*, то не наблюдается резкого снижения поглощения во время его денатурации, как это происходит с миоглобином или леггемоглобином, за исключением изменений в поглощении, которые трудно обнаружить. На рис. 2, *a* и *b* показаны спектры флуоресценции остатка триптофана в леггемоглобине (рН 7,0) в присутствии мочевины и Gdn-HCl соответственно. В случае леггемоглобина максимум эмиссии находился при 336 нм и интенсивность флуоресценции возрастала в обоих случаях наряду со сдвигом в красную область на 10 и 32 нм, соответственно, из-за денатурации с участием мочевины и Gdn-HCl. Аналогично в случае миоглобина (не показано) максимум эмиссии сдвигался к 352 и 358 нм в присутствии мочевины и Gdn-HCl соответственно.

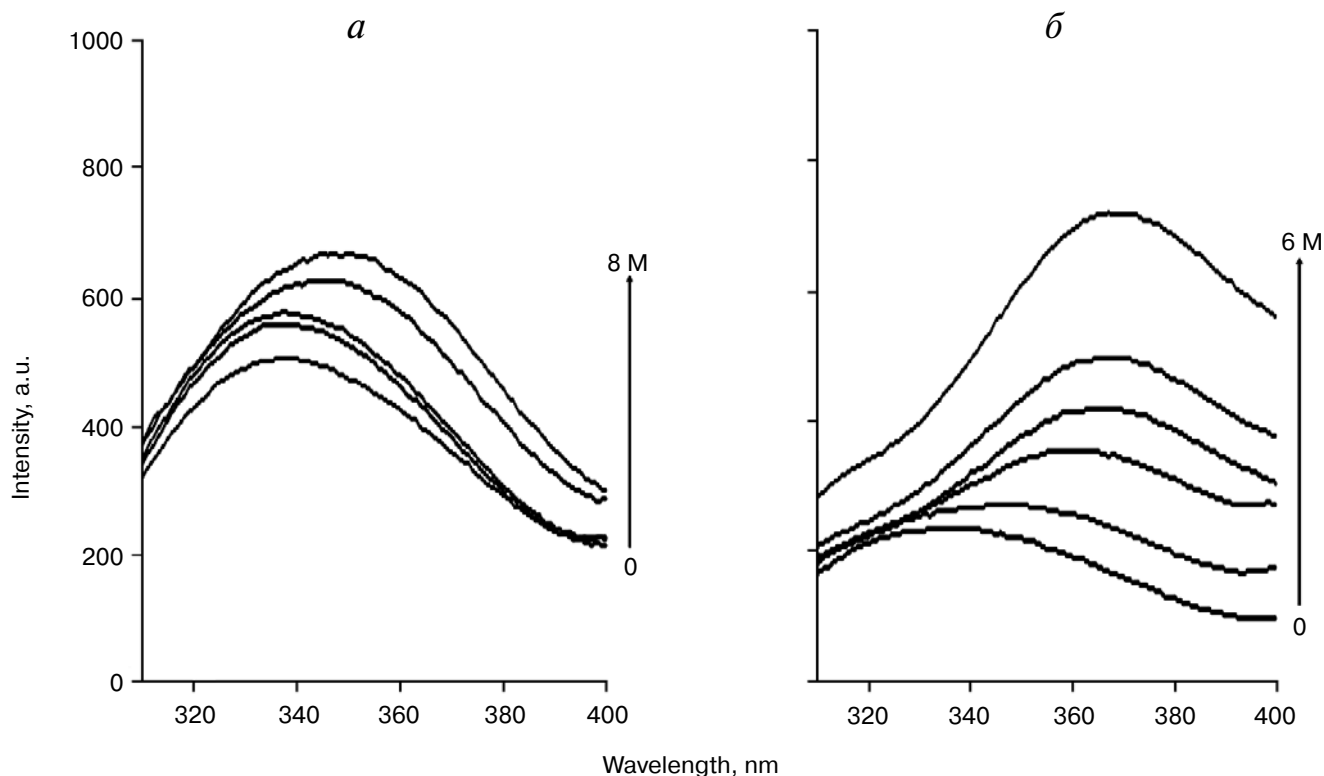
В обоих экспериментах наблюдался сдвиг в красную область, что указывает на экспонирование остатков триптофана в полярное микроокружение в денатурированном состоянии. Сходным образом, сдвиг на 16 и 18 нм в красную

область наблюдался в случае денатурации цитохрома *c* при максимуме эмиссии при 338 нм для его нативной формы. Кривые разворачивания с участием мочевины и Gdn-HCl были проанализированы путем сравнения их с механизмами двух состояний (рис. 3).

Уравнения (1), (2) и (3) показывают, что значения  $\Delta G_D$  находятся в ограниченном регионе линейной зависимости от концентрации денатурирующего вещества, где значение  $\Delta G_D$  может быть измерено. Сходные результаты были получены со многими другими белками [14]. Простейшим методом для оценки конформационной стабильности в отсутствие денатурирующего вещества,  $\Delta G_{D,H_2O}$ , является допущение, что эта линейная зависимость продолжается до нулевой концентрации и использование метода наименьших квадратов для введения данных в уравнение (3). Более низкие значения  $\Delta G_D$  и  $C_m$  у леггемоглобина по сравнению с миоглобином и цитохромом *c* (табл. 1, рис. 4–6) указывают на большую структурную и конформационную стабильность леггемоглобина.



**Рис. 1.** Изменение спектра поглощения миоглобина (*a*, *б*) и цитохрома *c* (*в*, *z*) в присутствии мочевины и гуанидин-гидрохлорида (при возрастающей концентрации) во время измерения переходных состояний белка при его разворачивании



**Рис. 2.** Изменение интенсивности флуоресценции леггемоглобина (*а*, *б*) в присутствии различных концентраций мочевины и Gdn-HCl во время измерения переходных состояний белка при его разворачивании

Значения  $m$  представляют коррелированные изменения площади поверхности, доступной для растворителя (SASA – solvent accessible surface area), сопровождающиеся образованием переходных состояний белка. Значения  $m$  имеют отношение к переходному состоянию сворачивания

белка. Состояния расплавленной глобулы у белков представляют собой компактные состояния, которые обладают сходной с нативным состоянием вторичной структурой, более экспонированной гидрофобной поверхностью, чем в нативном белке, и возможно третичной струк-

**Таблица 1.** Параметры переходных состояний при разворачивании: оценка процесса разворачивания проводилась в 0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 7,0; были рассчитаны изменения величин свободной энергии и средней точки для переходных состояний при разворачивании для всех гемопротеинов в нативном и развернутом состоянии в зависимости от присутствия 8 М мочевины и 6 М гуанидин-гидрохлорида

Белок и денатурирующее вещество	$\Delta G_D$ (Ккал моль <sup>-1</sup> )	$m$ (кал моль <sup>-1</sup> М <sup>-1</sup> )	$C_m$ (Моль)
Леггемоглобин + мочевины	0,56	215,30	2,60
Леггемоглобин + гуанидин-гидрохлорид	1,70	399,00	4,26
Миоглобин + мочевины	3,00	375,20	7,99
Миоглобин + гуанидин-гидрохлорид	2,268	956,00	2,37
Цитохром <i>c</i> + мочевины	2,88	373,00	7,73
Цитохром <i>c</i> + гуанидин-гидрохлорид	3,90	1178,50	3,30

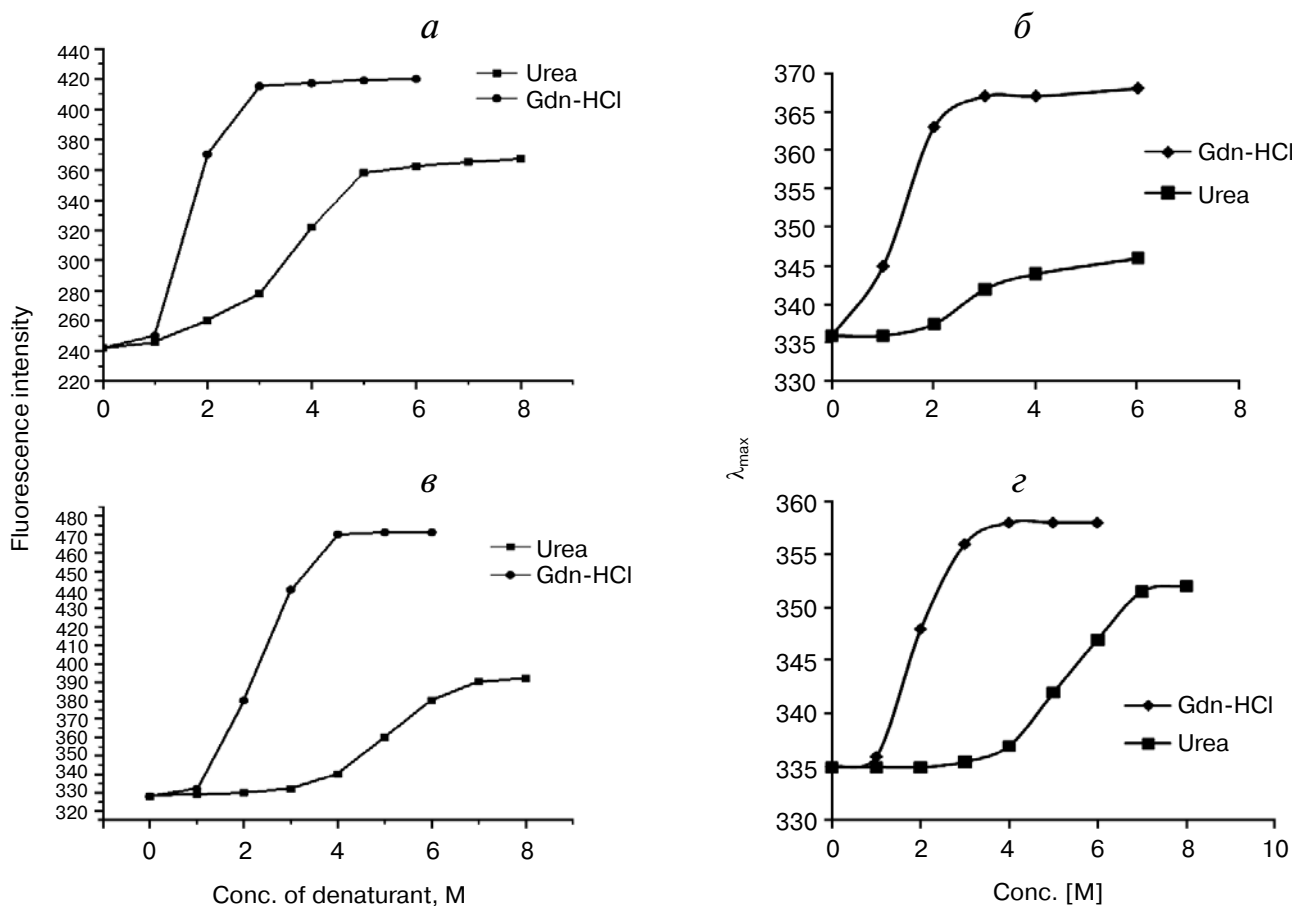
турой (как было показано в работе Долгих с соавт. [15–16]). Такие состояния обнаруживаются как в равновесном, так и промежуточном кинетическом состоянии при сворачивании [17]. Согласованные значения  $m$  в условиях денатурации означают, что все белки подвергаются структурным изменениям, происходящим, в основном, внутри экспонированной гидрофобной поверхности вместе с конформационными переходами. Значение  $m$  для цитохрома  $c$  и миоглобина ниже, когда они подвергаются денатурации мочевиной в сравнении с Gdn-HCl. Это может отражать небольшое количество аминокислотных остатков, экспонированных в процессе разворачивания при использовании мочевины (в сравнении с Gdn-HCl). Максимум эмиссии для флуоресценции остатка триптофана в леггемоглобине сдвигался на 10 и 32 нм при денатурации мочевиной и Gdn-HCl соответственно. Было обнаружено, что  $\lambda_{\text{макс}}$  эмиссии флуорес-

ценции сдвигался на 17 и 23 нм для миоглобина и 16 и 18 нм для цитохрома  $c$ . Сдвиг положения  $\lambda_{\text{макс}}$  в спектрах флуоресценции во время конформационных переходов мочевиной можно представить в следующем виде: миоглобин > цитохром  $c$  > леггемоглобин. Для Gdn-HCl этот порядок выглядит следующим образом: леггемоглобин > миоглобин > цитохром  $c$ .

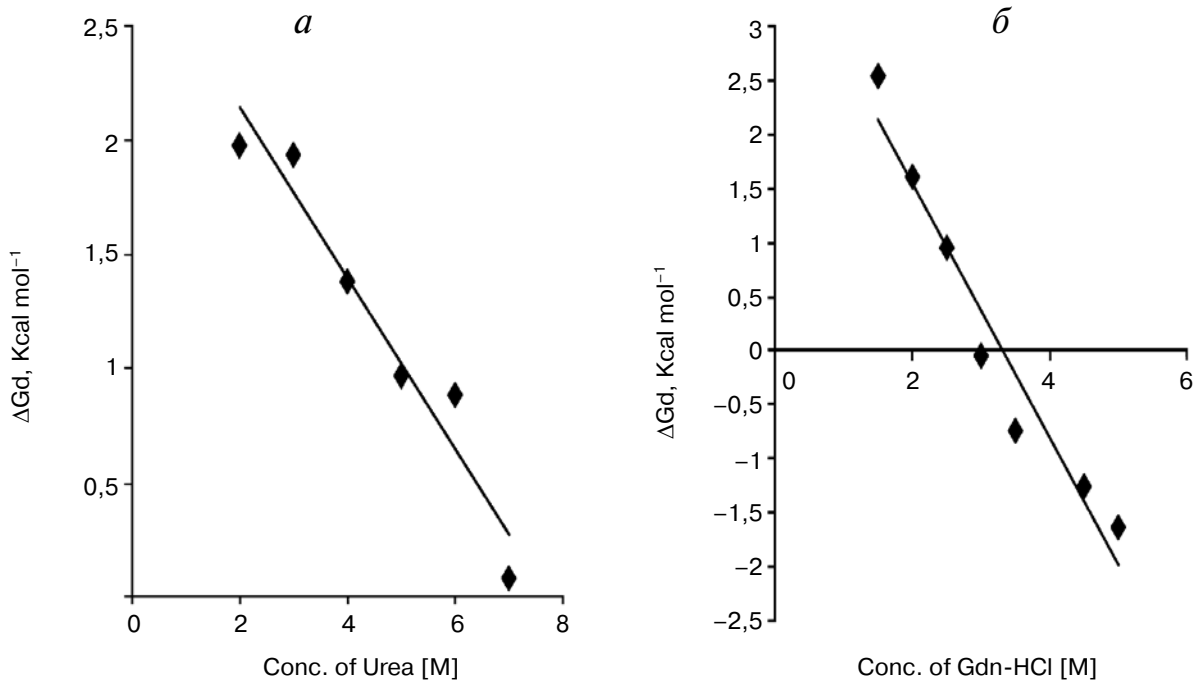
Во время измерения продолжительности жизни остатков триптофана, предполагаемую линию измеряли с помощью раствора Ludox. Была получена экспоненциальная кривая, которая была приведена к сумме экспоненциальных значений

$$F(\chi, t) = \sum f_{i\text{exp}}(-t/\tau_i),$$

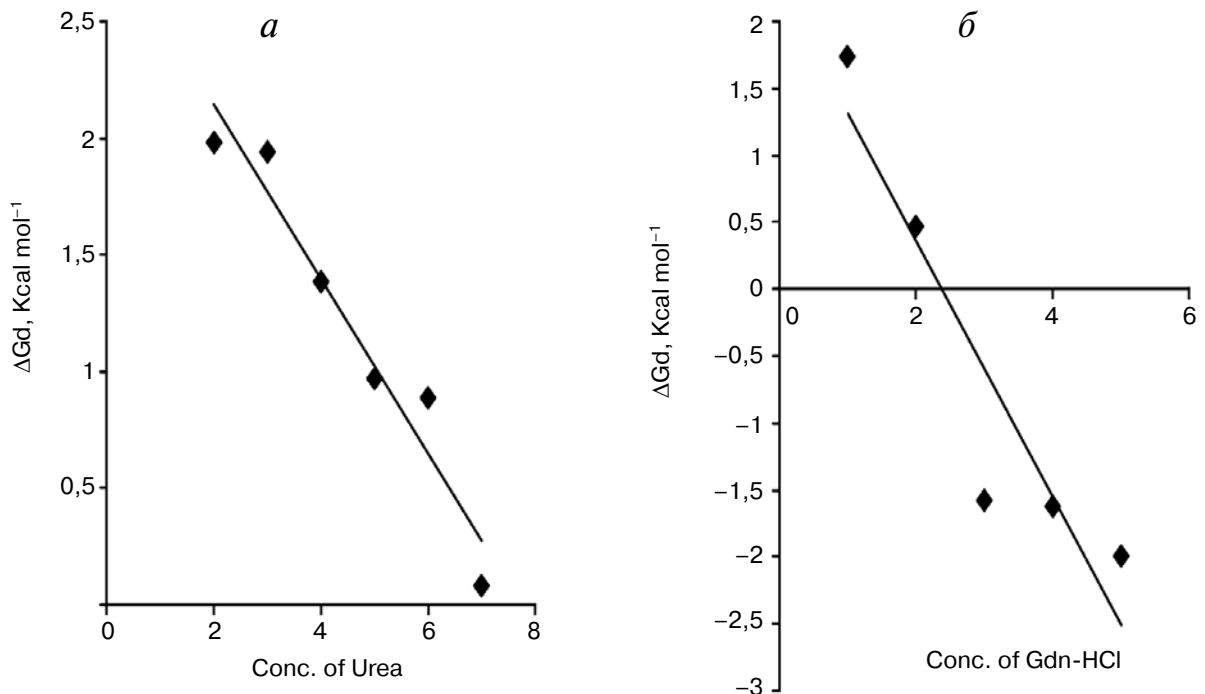
где  $F(t)$  – интенсивность флуоресценции в момент времени  $t$ ,  $\alpha_i$  – предэкспоненциальный фактор, представляющий частичный вклад в



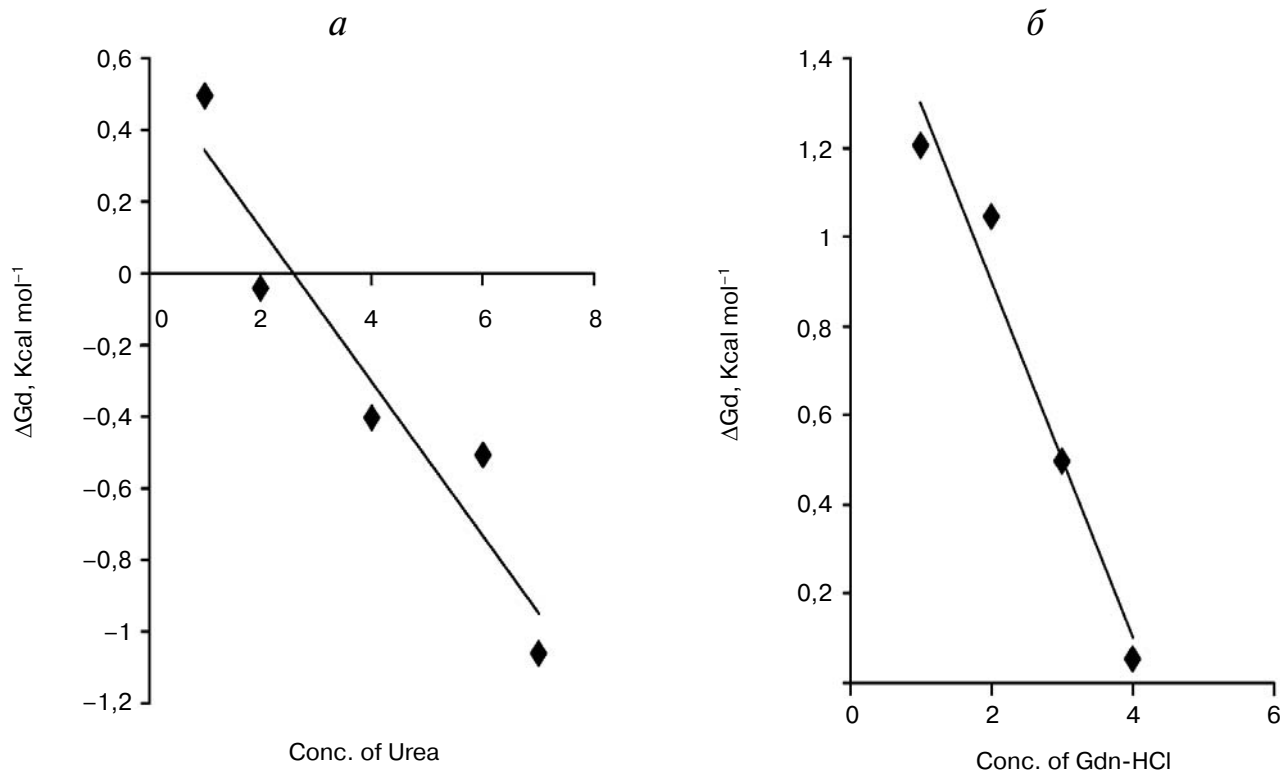
**Рис. 3.** Длина волны максимума интенсивности флуоресценции эмиссии флуоресценции леггемоглобина (а, б) и миоглобина (в, г) в 100 мМ фосфатном буфере, рН 7,0, при 25° в зависимости от концентрации мочевины и гуанидин-гидрохлорида во время изучения переходных состояний белка при его разворачивании. Кривая является лучшим нелинейным представлением наименьших квадратов объединенных данных в модели линейной экстраполяции двух состояний



**Рис. 4.** Изменение свободной энергии при разворачивании леггемоглобина в зависимости от концентрации мочевины (а) и гуанидин-гидрохлорида (б). Экспериментальные значения  $\Delta G_D$  были получены с использованием уравнений (1) и (2) при измерении переходных состояний белка при его разворачивании. Экстраполяция линии представляет значения  $\Delta G_{D,H_2O}$  для мочевины = 0,56 Ккал моль<sup>-1</sup> и  $\Delta G_{D,H_2O}$  для Gdn-HCl = 1,70 Ккал моль<sup>-1</sup>



**Рис. 5.** Изменение свободной энергии при разворачивании миоглобина в зависимости от концентрации мочевины (а) и гуанидин-гидрохлорида (б). Экспериментальные значения  $\Delta G_D$  были получены с использованием уравнений (1) и (2) при измерении переходных состояний белка при его разворачивании. Экстраполяция линии представляет значения  $\Delta G_{D,H_2O}$  для мочевины (3,00 Ккал моль<sup>-1</sup>) и  $\Delta G_{D,H_2O}$  для Gdn-HCl (2,268 Ккал моль<sup>-1</sup>)



**Рис. 6.** Изменение свободной энергии при разворачивании цитохрома *c* в зависимости от концентрации мочевины (*a*) и гуанидин-гидрохлорида (*б*). Экспериментальные значения  $\Delta G_D$  получены с использованием уравнений (1) и (2) во время измерения переходных состояний белка при его разворачивании. Экстраполяция линии представляет значения  $\Delta G_{D,H_2O}$  для мочевины (2,88 Ккал моль<sup>-1</sup>) и  $\Delta G_{D,H_2O}$  для Gdn-HCl (3,90 Ккал моль<sup>-1</sup>)

значение времени разрешенного во времени падения *i*-того компонента с продолжительностью жизни  $\tau_i$ .

Среднее значение продолжительности флуоресценции ( $\tau_0$ ) получали согласно формулам:

$$\tau_0 = \sum \alpha_i \tau_i$$

и

$$\alpha_i = f_i \tau_i / \sum f_i \tau_i.$$

Здесь предэкспоненциальный фактор  $\alpha$  также зависит от взаимодействия остатка триптофана белка.

Действительный график падения был получен путем вычитания предполагаемой кривой из графика падения.

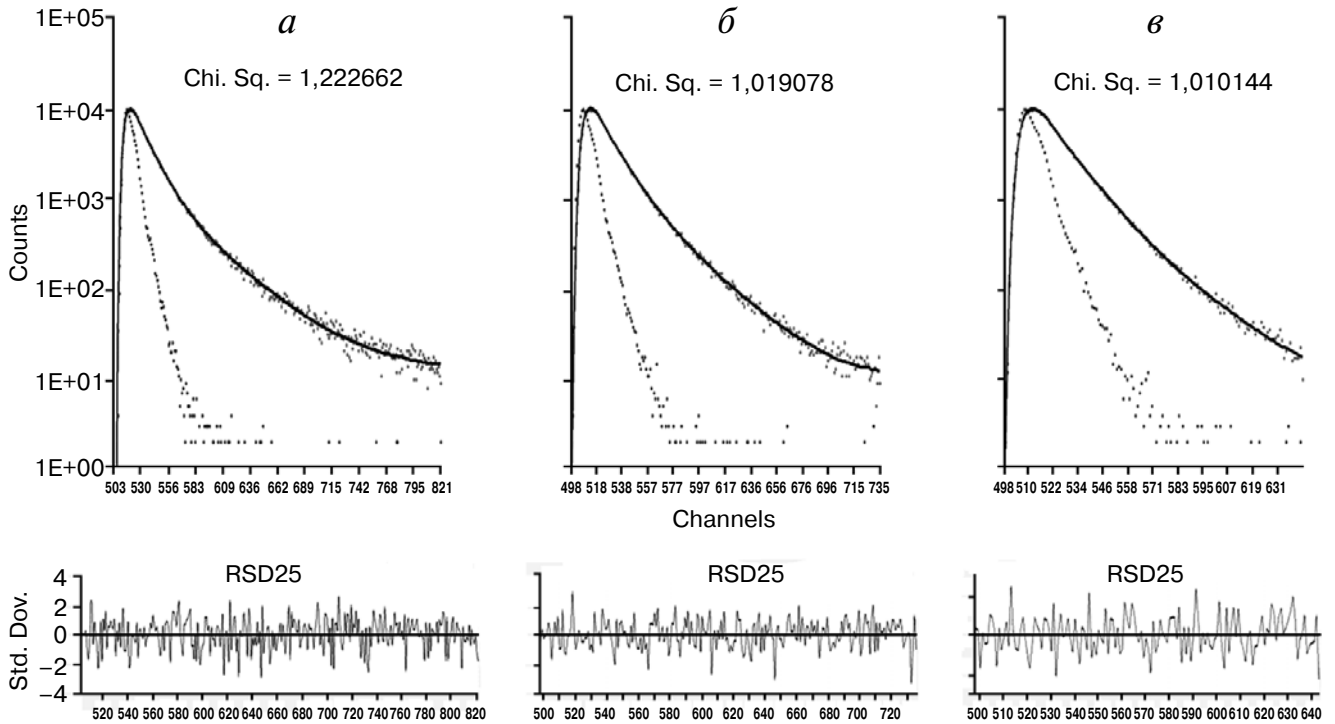
Денатурация уменьшает контакт между триптофаном и его микроокружением, в то же время, напротив, увеличивая экспонирование остатка триптофана в растворитель. Время падения флуоресценции остатка триптофана в нативном леггемоглобине, миоглобине и цитохро-

ме *c* равнялось 2,57, 2,32 и 2,12 нс соответственно (табл. 2). В случае 8 М мочевины время падения леггемоглобина, миоглобина, цитохрома *c* равнялось 2,84, 2,77 и 2,41 нс, а в присутствии 6 М Gdn-HCl время падения равнялось 2,87, 2,73 и 2,35 нс соответственно (табл. 2). Время падения эмиссии остатка Trp в развернутых белках всегда увеличивалось при сравнении с нативными белками, что свидетельствует в пользу конформационного перехода гемопротеинов (рис. 7–9).

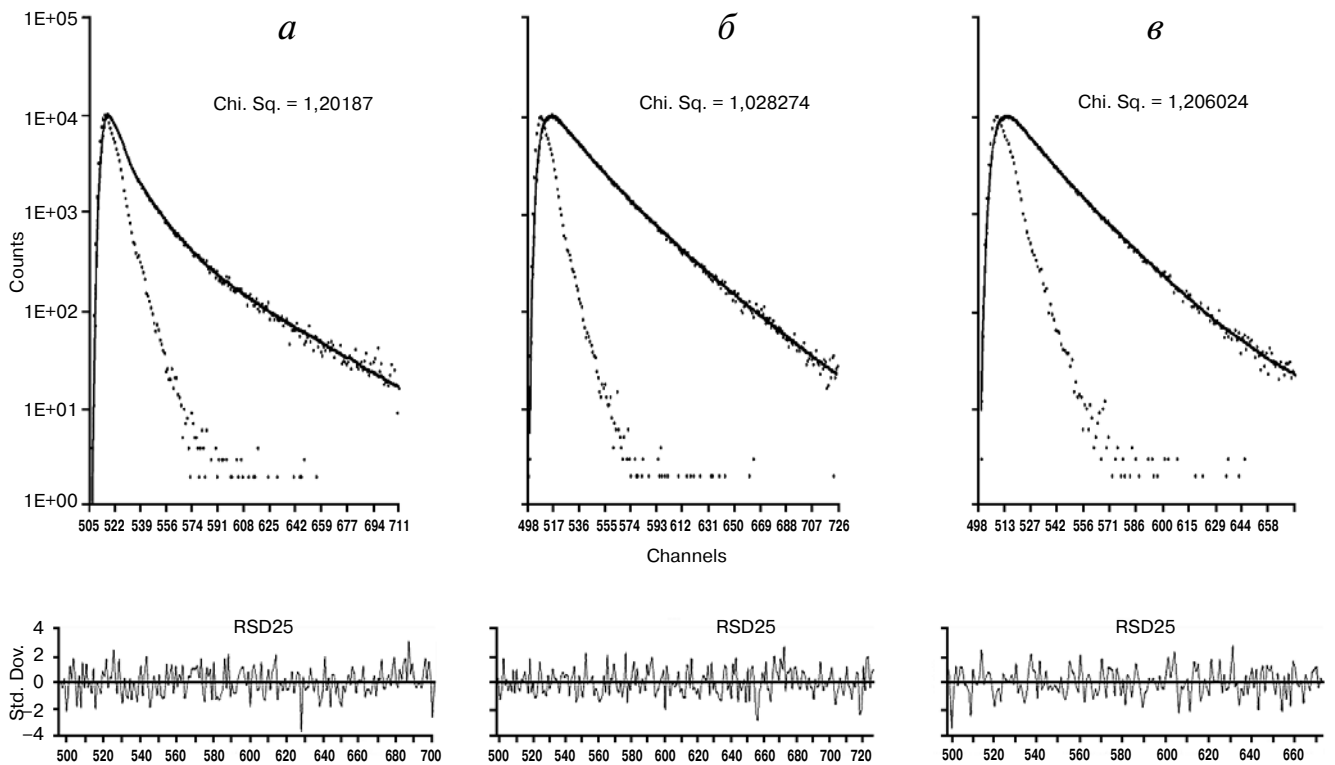
В случае гемопротеинов, во время образования переходных состояний при разворачивании белковой части, гем может диссоциировать из глобиновой части. Таким образом, разворачивание облегчает тушение флуоресценции остатка триптофана гемом, который увеличивает интенсивность флуоресценции и соответственно продолжительность флуоресценции [18]. Это очень интересное наблюдение, которое характерно для процесса разворачивания гемопротеинов в отличие от обычных глобулярных белков.

Образование переходных состояний при разворачивании белков может модулировать на-

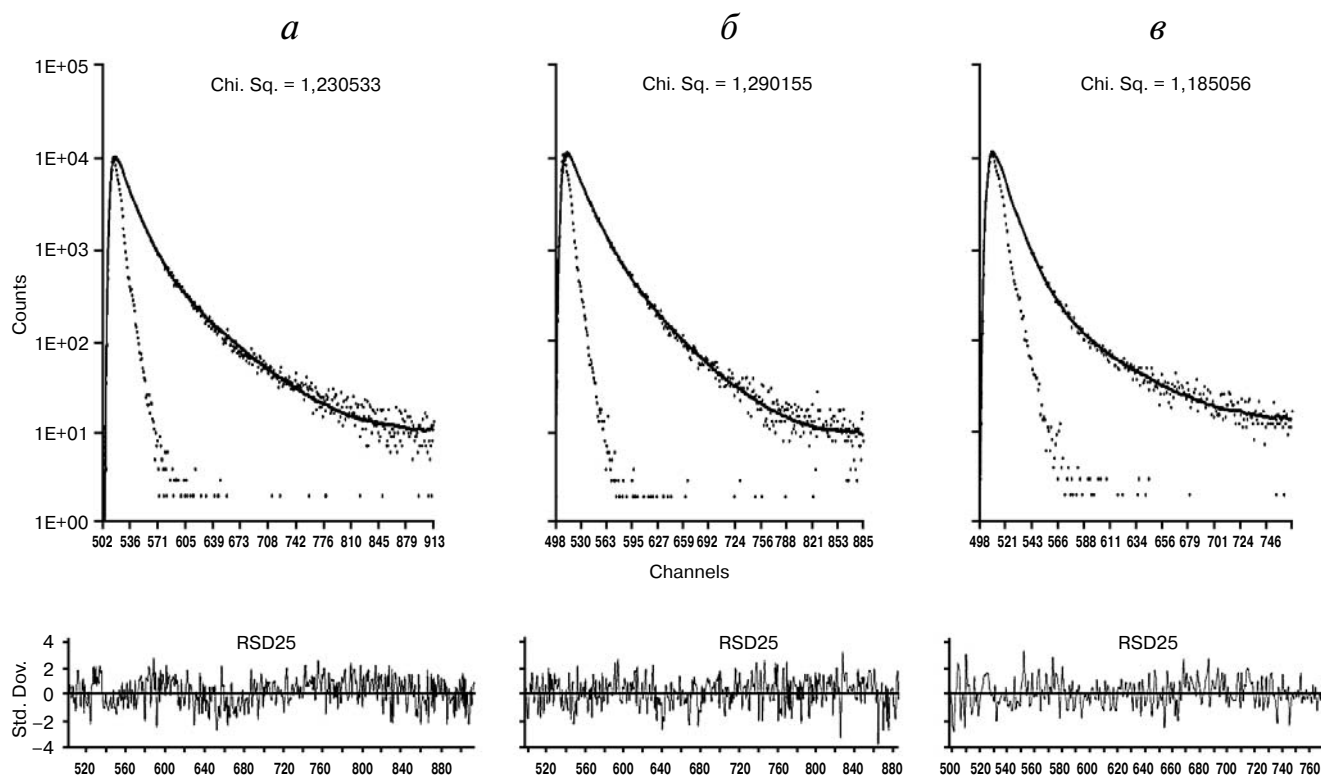




**Рис. 7.** Исследование нативного (а) и денатурированного мочевиной (б) и гуанидин-гидрохлоридом (Gdn-HCl) (в) цитохрома с с помощью TCSPC. Измерения развертывания проводили в 100 мМ фосфатном буфере, pH 7,0, при 25°



**Рис. 8.** Исследование нативного (а) и денатурированного мочевиной (б) и гуанидин-гидрохлоридом (Gdn-HCl) (в) миоглобина с помощью TCSPC. Измерения развертывания проводили в 100 мМ фосфатном буфере, pH 7,0, при 25°



**Рис. 9.** Исследование нативного (а) и денатурированного мочевиной (б) и гуанидин-гидрохлоридом (Gdn-HCl) (в) леггемоглобина с помощью TCSPC. Измерения развертывания проводили в 100 мМ фосфатном буфере, рН 7,0, при 25°

**Таблица 2.** Профиль ime-correlated single photon counting в присутствии денатурирующего агента: данные продолжительности флуоресценции леггемоглобина, миоглобина и цитохрома с в отсутствие и в присутствии 8 М мочевины и 6 М гуанидин-гидрохлорида. Длина волны возбуждения – 295 нм, длина волны эмиссии – 330 нм

Состояние белка	T1 (нсек)	T2 (нсек)	T(3) (нсек)	Среднее время жизни (нс)	Chi площадь
Цитохром с (нативный)	0,312	1,54	4,508	2,12	1,22
Цитохром с + 8 М мочевина	0,396	1,90	4,96	2,41	1,019
Цитохром с + 6 М гуанидин-гидрохлорид	0,48	1,8	4,77	2,350	1,01
Миоглобин (нативный)	0,324	1,69	4,94	2,32	1,20
Миоглобин + 8 М мочевина	0,325	2,38	5,62	2,775	1,02
Миоглобин + 6 М гуанидин-гидрохлорид	0,358	2,16	5,70	2,739	1,20
Леггемоглобин (нативный)	0,338	1,75	5,62	2,57	1,23
Леггемоглобин + 8 М мочевина	0,403	1,71	6,43	2,847	1,29
Леггемоглобин + 6 М гуанидин-гидрохлорид	0,363	1,87	6,40	2,877	1,18

тивную конформацию, стабильность и экспонирование на поверхности биологически активных белков. Правильным образом свернутые белки могут выживать в течение продолжительного времени в биологически населенной среде, но присутствие различных денатурирующих веществ может изменить их третичную структуру. В нашей работе представлена модель для изучения процесса образования переходных состояний гемопротеинов во время их развертывания, в которой используется измерение сигналов флуоресценции, таких как интенсивность стационарной флуоресценции, средняя продолжитель-

ность флуоресценции и предэкспоненциальные факторы, для измерения интенсивности падения сигнала в связи с чувствительностью флуорофора к изменениям в его микроокружении.

Авторы выражают благодарность Всемирному банку за предоставленную стажировку П. Басак; а также DST (FIST), проекту Всемирный банк-ICZMP, проектам при поддержке Правительства Индии UGC-CAS, UGC-UPE, DBT-IPLS за возможность использовать оборудование на кафедре биохимии Университета Калькутты.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Monera, O.D., Kay, C.M., and Hodges, R.S. (1994) Protein denaturation with guanidine hydrochloride or urea provides a different estimate of stability depending on the contributions of electrostatic interactions, *Prot. Sci.*, **3**, 1984–1991.
2. Amiri, M., Jankeje, K., and Albani, J.R. (2010) Origin of fluorescence lifetimes in human serum albumin. Studies on native and denatured protein, *J. Fluorescence*, **20**, 651–656.
3. Appleby, C.A. (1969) Properties of leghaemoglobin *in vivo* and its isolation as ferrous oxyleghaemoglobin, *Biochem. Biophys. Acta*, **188**, 222–226.
4. Aviram, I., and Weissmann, C. (1978) Spectrophotometric and fluorometric study of the denaturation of Euglena cytochrome c-552, *Biochemistry*, **10**, 2020–2025.
5. Schechter, A.N., and Epstein, C.J. (1968) Spectral studies on the denaturation of Myoglobin, *J. Mol. Biol.*, **35**, 567–589.
6. Otting, G., Liepinsh, E., and Wuthrich, K. (1991) Protein hydration in aqueous solution, *Science*, **254**, 974–980.
7. Denisov, V.P., and Halle, B. (1996) Protein hydration dynamics in aqueous solution, *Faraday Discuss.*, **103**, 227–244.
8. Basak, P., and Bhattacharyya, M. (2013) Intrinsic tryptophan fluorescence and related energy transfer in Leghemoglobin isolated from *Arachis hypogea*, *Turkish J. Biochem.*, **38**, 9–13.
9. Yagi, M., Sakurai, K., Kalidas, C., Batt, C.A., and Goto, Y. (2003) Reversible unfolding of bovine  $\beta$ -lactoglobulin mutants without a free thiol group, *J. Biol. Chem.*, **278**, 47009–47015.
10. Albani, J.R. (2011) Sub-structures formed in the excited state are responsible for tryptophan residues fluorescence in  $\beta$ -lactoglobulin, *J. Fluorescence*, **21**, 1683–1687.
11. Losytskyy, M.Y., Kovalska, V.B., Varzatskii, O.A., Sergeev, A.M., Yarmoluk, S.M., and Voloshin, Y.Z. (2013) Interaction of the iron (II) cage complexes with proteins: protein fluorescence quenching study, *J. Fluorescence*, **23**, 889–895.
12. Puett, D. (1973) The equilibrium unfolding parameters of horse and sperm whale Myoglobin: effects of guanidine hydrochloride, urea and acid, *J. Biol. Chem.*, **248**, 4623–4634.
13. Zhang, C., Gao, C., Mu, J., Qiu, Z., and Li, L. (2013) Spectroscopic studies on unfolding processes of apo-neuroglobin induced by guanidine hydrochloride and urea, *Biomed Res. Int.*, DOI: 10.1155/2013/349542.
14. Zarog, M.S., and Tayyab, S. (2012) Formation of molten globule-like state during acid denaturation of *Aspergillus niger* glucoamylase, *Process Biochem.*, **47**, 775–784.
15. Dolgikh, D.A., Gilmanshin, R.I., Brazhnikov, E.V., Bychkova, V.E., Semisotnov, G.V., Venyaminov, S.Yu., and Ptitsyn, O.B. (1981) Alpha-Lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure? *FEBS Lett.*, **136**, 311–315.
16. Ohgushi, M., and Wada, A. (1983) Molten globule state: a compact form of globular proteins with mobile side chains, *FEBS Lett.*, **164**, 21–24.
17. Arai, M., and Kuwajima, K. (1996) Rapid formation of a molten globule intermediate in refolding of alpha-lactalbumin, *Folding Design*, **1**, 275–287.
18. Eftink, M.R. (1994) The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins, *Biophys. J.*, **66**, 482–501.

**DENATURATION PROPERTIES  
AND FOLDING TRANSITION STATES  
OF LEGHEMOGLOBIN AND OTHER HEME  
PROTEINS**

**Pijush Basak<sup>1</sup>, Niloy Kundu<sup>2</sup>, Rudradip Pattanayak<sup>1</sup>,  
Maitree Bhattacharyya<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> *University of Calcutta, Department of Biochemistry,  
Ballygunge Circular Road 35, Kolkata 700019, India;  
fax: +91(33)246-14849, E-mail: bmaitree@gmail.com*

<sup>2</sup> *Department of Chemistry Indian Institute of Technology  
Kharagpur, Kharagpur 721302, India;  
fax: +91(32)22-282252*

Received September 25, 2014  
Revision received November 20, 2014

This work reports unfolding transitions of monomeric heme proteins leghemoglobin, myoglobin, and cytochrome *c* utilizing UV-Vis spectra and steady-state and time-resolved fluorescence methods. The conformational stabilities of native «folded» state of the proteins and their «unfolded» states were investigated in the light of a two-state transition model. Two-state transition values for  $\Delta G_D$  (298 K) were obtained by denaturation with chaotropic agents like urea and guanidium hydrochloride (GdnHCl). The free energy value of leghemoglobin is the lowest compared to cytochrome *c* and myoglobin along the denaturation pathway. The *m* value is also the lowest for leghemoglobin compared to cytochrome *c* and myoglobin. The *m* value (a measure of dependence of  $\Delta G_D$  on denaturant concentration) for cytochrome *c* and myoglobin is lower when it is denatured with urea compared to guanidine hydrochloride. UV-Vis absorbance maximum and steady-state fluorescence emission maximum were drastically red shifted in the presence of a certain denaturant concentration both in cases of myoglobin and leghemoglobin, but the scenario is different for cytochrome *c*. The results were analyzed using a two-state transition model. The lifetime data clearly indicated the presence of an intermediate state during denaturation. The unfolding transition may modulate the conformation, stability, and surface exposure of these biologically important proteins.

*Key words:* denaturation, heme protein, Gibbs free energy, two-state transition, chaotropic agent