



УДК 577.152.34.088 : 543 + 422.6

© 1994 А. А. Шевченко, О. А. Кост, Н. Ф. Казанская

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ СТРУКТУРЫ И
КОНФОРМАЦИОННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ БЕЛКОВ ПО ВТОРЫМ
ПРОИЗВОДНЫМ УФ-СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет*

Предложен количественный метод оценки структуры и конформационной устойчивости белков, основанный на индивидуальном поглощении остатков тирозина во вторых производных спектров. В качестве модельных белков использованы субтилизины Carlsberg, BPN' и 72. На основе величины возрастания пика Tug при 282,3 нм во вторых производных спектров при полной денатурации белка и количества остатков Tug на одну молекулу по вторым производным спектров нативных субтилизинов рассчитано количество доступных растворителю и «скрытых» в белке остатков Tug, коррелирующее с литературными данными. Предложена математическая модель спектральных изменений, сопровождающих переход остатков Tug из «скрытой» в экспонированную форму. Показана применимость метода вторых производных спектров для определения констант денатурации белков, содержащих в нативном состоянии «скрытые» для растворителя остатки Tug.

Преимущества использования вторых производных УФ-спектров неоднократно отмечались в литературе [1]. Так, с их помощью можно выделить индивидуальные компоненты поглощения остатков Phe, Tug и Tgr, которые неразрешимы в обычном спектре из-за их взаимного перекрывания и побочного поглощения. Во многих случаях этот метод позволяет получить информацию о местоположении и количестве полос поглощения, недоступную при использовании обычных спектров. Кроме того, метод дает возможность идентифицировать индивидуальные компоненты даже в растворах с высокой мутностью и при высоком фоновом поглощении. При исследованиях спектров удобно использовать график именно второй производной, поскольку он по своей форме, как график четной производной, близок к исходной функции, что облегчает интерпретацию получаемых результатов.

Применение метода второй производной спектра к белкам позволяет выделить индивидуальные компоненты поглощения остатков ароматических аминокислот Tug, Tgr и Phe, которые неразрешимы в обычном спектре белка из-за взаимного перекрывания и побочных поглощений [1].

В настоящее время метод производных спектров активно применяется для качественного и количественного анализа низкомолекулярных веществ [2], а в случае белков — в первую очередь для количественного определения ароматических аминокислотных остатков [3]. Кроме того, он может быть использован для количественного анализа состава смесей, если известны индивидуальные спектры компонентов [4]. Однако, на наш взгляд, методу вторых производных спектров уделяется недостаточно внимания при исследованиях конформационной

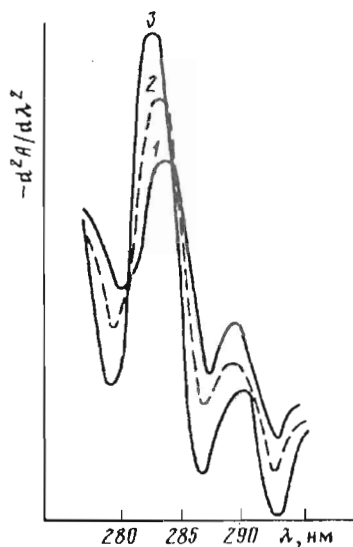


Рис. 1

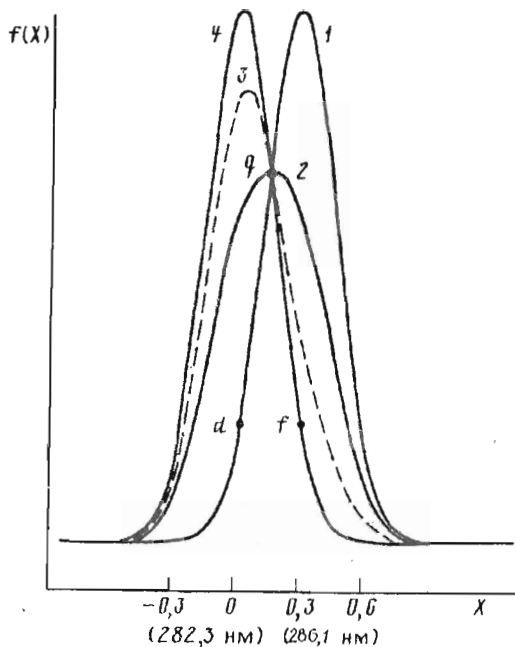


Рис. 2

Рис. 1. Вторые производные спектров нативного (1), частично денатурированного (2) и полностью денатурированного (3) субтилизина 72 (0,05 М ацетатный буфер, рН 3,9, 25° С)

Рис. 2. Зависимость функции $f(x)$ от параметра N , моделирующая изменение распределения остатков тирозина в белке, $N = 0$ (1), 5 (2), 8 (3) и 10 (4)

устойчивости белков. Ранее отмечалось [5], что денатурационные процессы в белках могут сопровождаться перераспределением интенсивности и коротковолновым сдвигом максимумов остатков тирозина и триптофана.

Настоящая работа посвящена разработке количественного метода оценки структуры и конформационной устойчивости белков, основанного на индивидуальном поглощении остатков тирозина во вторых производных спектров.

В качестве модельных белков для апробации метода второй производной спектра и разработки количественных критериев нами были выбраны субтилизины Carlsberg, BPN' и 72. Для ферментов этого семейства известны их первичная и третичная структуры, определена устойчивость в различных условиях [6]. Так, известно, что субтилизины устойчивы в нейтральных и щелочных растворах (рН 6—10), но при рН < 5 быстро и необратимо денатурируют [6].

Эксперименты, проведенные нами с целью получения вторых производных спектров субтилизинов, показали, что в графиках вторых производных можно достаточно точно идентифицировать пики, соответствующие различным ароматическим аминокислотам. Так, пик в области 290 нм относится к остаткам триптофана, пик в области 284 нм — к остаткам тирозина, а пики в интервале 245—265 нм — к остаткам фенилаланина, причем в жестких денатурирующих условиях графики второй производной спектров исследованных белков изменялись: смещался максимум пика, соответствующий остаткам тирозина, изменялись интенсивности пиков тирозина и триптофана. Таким образом, существовала принципиальная возможность слежения за конформационными изменениями в белках.

Независимыми методами — по изменению активности и по изменению спектров КД и флуоресценции — нами была охарактеризована устойчивость субтилизина 72 в кислой среде (рН 2,5—4,5). В этих условиях, как и ожидалось, субтилизин 72 необратимо теряет активность, причем процесс денатурации описывается

кинетикой первого порядка во всем исследованном интервале значений pH и диапазоне концентраций ($1,0 \cdot 10^{-7}$ — $5,0 \cdot 10^{-5}$ М). Денатурация субтилизина 72 сопровождалась изменением интенсивности флуоресценции триптофановых остатков и уменьшением отрицательной эллиптичности при 220 нм, соответствующей содержанию в белке α -спиралей. Оказалось, что константы денатурации первого порядка, определенные тремя независимыми методами — по потере ферментом активности, по изменению интенсивности флуоресценции и по изменению значения эллиптичности при 220 нм, — совпадали между собой. Например, при pH 3,9 $k_1 = 4,1 \cdot 10^{-4}$ с⁻¹ для всех трех методов. Таким образом, показано, что процесс разворачивания белковой глобулы субтилизина 72 протекает синхронно с потерей ферментом активности.

Основываясь на изменениях второй производной спектра субтилизина 72 в кислой среде во времени (рис. 1), мы предложили математическую модель, описывающую этот процесс. Мы исходили из того, что рост интенсивности пика тирозина, наблюдающийся при денатурации субтилизина, и его коротковолновый сдвиг вплоть до 282,3 нм обусловлены переходом ранее «скрытых» в белке остатков тирозина в водное окружение, т. е. уменьшением полуширины пика тирозина в исходном спектре за счет стандартизации микроокружения этих остатков. Для моделирования перехода остатков Туг в водное окружение мы использовали следующую функцию (числовые значения в которой подобраны эмпирически):

$$f(x) = N \cdot \exp(-x^2/0,0576) + (10-N) \cdot \exp(-(x-0,3)^2/0,0576).$$

Эта функция представляет собой сумму двух перекрывающихся гауссовых кривых, моделирующих «скрытый» тирозин в белке и тирозин в водном окружении. Изменяя от 0 до 10 параметр N , мы можем следить за перераспределением интенсивности между этими двумя кривыми (рис. 2). Значение N , равное 0, соответствует гипотетической конформации белка, в которой все остатки тирозина находятся внутри белковой глобулы и недоступны растворителю. Значение N , равное 10, соответствует, напротив, полной экспонированности остатков тирозина и их доступности растворителю. Промежуточные значения N соответствуют, естественно, промежуточным конформационным состояниям.

Из рассмотрения модели следует, что изменение интенсивности при определенной длине волны пропорционально изменению параметра N . Для слежения удобно выбрать длину волны 282,3 нм, соответствующую максимуму пика тирозина при полной денатурации белка, т. е. соответствующую полностью гидратированным остаткам тирозина. Таким образом, следя за интенсивностью пика, мы можем следить за степенью денатурированности субтилизина, что дает возможность рассчитывать константы инактивации.

Приняв все изменение интенсивности на длине волны 282,5 нм при денатурации субтилизина 72 за единицу и построив график зависимости натурального логарифма доли изменения интенсивности от времени, мы рассчитали по тангенсу угла наклона получившейся прямой константу скорости инактивации первого порядка для субтилизина 72 при pH 3,9. Значение $k_1 = (4,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$ с⁻¹ хорошо согласуется со значением, полученным для денатурации субтилизина 72 по изменению активности, спектров флуоресценции и КД.

Таким образом, предложенный нами метод количественной обработки производных спектров может быть использован для определения констант скорости денатурации белков.

Другая важная информация, полученная из модели, — возможность рассчитывать число экспонированных в водную среду тирозиновых остатков. Как следует из модели (рис. 2), изобестическая точка (q) лежит посередине между максимумами слагаемых кривых. Зная ее положение для процесса денатурации белка (284,2 нм) и длину волны положения максимума пика поглощения гидратированных остатков тирозина при полной денатурации (282,3 нм), мы можем

Число экспонированных и скрытых в белке тирозиновых остатков, определенное в субтилизилах разными методами *

Субтилизин	Всего Tyr	Tyr эксп./Tyr скрыт.			
		ХМ	СТ	ПР	ПС
Carlsberg	13	7-9/6-4	6-8/7-3	8,8/4,2	8,0/5,0
BPN'	10	5-7/5-3	5-8/5-2	8,8/1,2	6,5/3,5
72	10	—	—	5-8/5-2 **	6,5/3,5

* ХМ — данные получены методом химической модификации групп [7, 8]; СТ — спектрофотометрическим титрованием [9, 10]; ПР — по пертурбации растворителем [11]; ПС — по вторым производным спектра.

** Данные работы [12].

найти длину волны максимума поглощения остатков тирозина, находящихся внутри белковой глобулы. Для этого нам нужно отложить расстояние, равное расстоянию между этими точками, от длины волны изобестической точки в сторону больших длин волн. Таким образом, мы получаем 286,1 нм — длину волны максимума поглощения «скрытых» остатков тирозина.

Определив интенсивность пика гидратированных остатков тирозина при рассчитанной нами длине волны 286,1 нм (точка f на рис. 2), мы можем предположить, в силу симметричности, что такой же будет и интенсивность пика, соответствующего гипотетической конформации, при которой все тирозиновые остатки «скрыты» в белке, — 282,3 нм (точка d на рис. 2). В этом случае разность в интенсивности между полученным значением и интенсивностью пика полностью гидратированных остатков тирозина при 282,3 нм дает нам возможность определить максимальное изменение интенсивности второй производной спектра при переходе от полностью «скрытых» всех остатков тирозина ко всем гидратированным. В результате, зная значение интенсивности второй производной спектра нативного белка при длине волны гидратированных остатков тирозина (282,3 нм), мы можем рассчитать долю экспонированных групп как отношение этого значения к интенсивности при 282,3 нм при полной денатурации белка. При известном аминокислотном составе белка можно, таким образом, рассчитать абсолютное количество экспонированных и «скрытых» остатков тирозина. Результаты расчета для субтилизинов представлены в таблице.

Полученные нами данные по степеням экспонированности остатков тирозина в растворитель для субтилизинов трех штаммов хорошо согласуются с литературными данными, полученными другими методами.

Таким образом, правомочность предложенного нами метода количественной обработки информации на основе второй производной спектров белков подтверждается как совпадением полученных различными методами констант денатурации субтилизина, так и совпадением данных по степени экспонированности остатков тирозина в растворитель в различных субтилизилах.

Экспериментальная часть

В работе использованы субтилизины Carlsberg и BPN' фирмы Sigma (США). Субтилизин 72 производства Московского опытного завода ферментных препаратов, гомогенный по электрофорезу в SDS-ПААГ, содержал 80% активных молекул по результатам титрования его навески *N-транс*-циннамоилимидазолом.

Спектры белков и их вторые производные получали на спектрофотометре Shimadzu 265 FW (Япония). Измерения проводили на длинах волн от 240 до 305 нм при ширине щели 1 нм и скорости сканирования «slow». Концентрацию белка в кювете варьировали в пределах 0,1—0,25 мг/мл ($3,6 \cdot 10^{-6}$ — $9 \cdot 10^{-6}$ М).

Инактивацию субтилизина 72 проводили путем инкубирования растворов фермента ($1,0 \cdot 10^{-7}$ — $5 \cdot 10^{-5}$ М) в 0,05 М ацетатном буфере, рН 2,5—4,5. Контроль за ходом инактивации осуществляли путем отбора проб через определенные промежутки времени и измерением активности по отношению к этиловому эфиру N-ацетил-L-тирозина на рН-стате ТТТ-2 Radiometer (Дания).

Полные кинетические кривые денатурации субтилизина 72 снимали на флуориметре Hitachi MPF-4 (Япония). Для этого раствор фермента ($1,0$ — $2,0$) $\cdot 10^{-7}$ М в 0,05 М ацетатном буфере помещали в кварцевую флуориметрическую кювету и прописывали полную кинетическую кривую изменения флуоресценции от времени при $\lambda_{\text{возб}}$ 296 нм, $\lambda_{\text{исп}}$ 350 нм.

Полную кинетическую кривую денатурации субтилизина 72 ($3,6 \cdot 10^{-6}$ М) в 0,01 М ацетатном буфере, рН 3,9, регистрировали также на дихрографе Mark III Jobin-Ivon (Франция) по изменению эллиптичности при 220 нм.

Данные по инактивации субтилизина 72 представляли в полулогарифмических координатах и определяли константы скоростей инактивации 1-го порядка.

Полные кинетические кривые денатурации субтилизина обрабатывали методом Гуттенгейма, линеаризуя экспериментальные данные в координатах: $\ln(\Phi_i - \Phi_f)$, t_i , где Φ_i и Φ_f — интенсивность флуоресценции или эллиптичность во времена t_i и $t_i + \Delta$. Тангенс угла наклона прямой $\ln(\Phi_i - \Phi_f) = \text{const} - k_{\text{эф}} \cdot t_i$ равен $k_{\text{эф}}$ — наблюдаемой константе денатурации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Демченко А. П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. Киев: Наук. думка, 1981.
2. Iza N., Gil M., Montero J. L., Morcillo J. // J. Mol. Struct. 1988. V. 175. № 1. P. 19—24.
3. Nozaki Y. // Arch. Biochem. and Biophys. 1990. V. 277. № 2. P. 324—333.
4. Mach H., Tomson J. A., Middaugh C. R. // Anal. Biochem. 1989. V. 181. № 1. P. 79—85.
5. Bigelow C. C., Gerschwind F. F. // C. r. Lab. Carlsberg. 1960. V. 31. P. 283—304.
6. Кост О. А. // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. 1988. Т. 14. С. 196—242.
7. Svendsen I. // C. r. Trav. Lab. Carlsberg. 1968. V. 36. № 19. P. 347—363.
8. Svendsen I. // C. r. Trav. Lab. Carlsberg. 1974. V. 39. № 12. P. 375—398.
9. Markland F. S. // J. Biol. Chem. 1969. V. 244. № 4. P. 694—700.
10. Schlessinger J., Roche R. S., Steinberg I. Z. // Biochemistry. 1975. V. 14. № 2. P. 255—262.
11. Myers B., Glazer A. N. // J. Biol. Chem. 1971. V. 246. № 2. P. 412—419.
12. Herskovits T. T., Fuchs H. H. // Biochim. et biophys. acta. 1972. V. 263. № 3. P. 468—476.

Поступила в редакцию
6.VII.1993

A. A. Shevchenko, O. A. Kost, N. F. Kazanskaya

A QUANTITATIVE METHOD FOR ESTIMATION OF STRUCTURE AND CONFORMATIONAL STABILITY OF PROTEINS BY THE SECOND DERIVATIVE UV SPECTROSCOPY

M. V. Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow

A quantitative method is suggested for estimating the structure and conformational stability of proteins based on the individual absorbance of Tyr residues in the second derivative UV spectra. Subtilisin Carlsberg, BPN' and 72 were chosen as the model proteins. The values of the increase of the Tyr absorption at 282,3 nm upon the total denaturation of the proteins made it possible to calculate the number of the exposed and «buried» tyrosine residues in the native proteins. A mathematical model of spectrum changes during the transition of Tyr residues from the «buried» to exposed form is suggested. The method is useful for the determination of the denaturation constants of proteins bearing «buried» tyrosine residues.