

Д.А. ДОЛГИХ, Л.В. АБАТУРОВ, Е.В. БРАЖНИКОВ,
Ю.О. ЛЕБЕДЕВ, Ю.Н. ЧИРГАДЗЕ, О.Б. ПТИЦЫН

КИСЛАЯ ФОРМА КАРБОАНГИДРАЗЫ: "РАСПЛАВЛЕННАЯ ГЛОБУЛА" С ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ

(Представлено академиком В.И. Гольданским 7 IV 1983)

Недавно нами было показано [1], что молекулы α -лактальбуминов коровы и человека могут под влиянием самых различных воздействий переходить в сходные между собой формы, различающиеся необычным сочетанием свойств нативных и развернутых белков. Они близки к нативной форме белка по компактности и вторичной структуре, но характеризуются симметризованным окружением ароматических и других боковых групп, аномально высокой скоростью дейтерообмена и отсутствием кооперативного температурного плавления. Нами была предложена модель такого "промежуточного" (между нативным и развернутым) состояния [1], согласно которой молекула белка в этом состоянии отличается от нативной прежде всего существенным увеличением амплитуды флуктуаций ее структуры вследствие небольшого увеличения молекулярных размеров и резкого ослабления ван-дер-ваальсовых и других специфических взаимодействий. Проф. А. Вада предложил для этого описанного нами состояния термин "расплавленная глобула".

Эта работа посвящена доказательству того, что аналогичное состояние наблюдается и в другом глобулярном белке — карбоангидразе В, которая функционально и структурно совершенно отлична от α -лактальбуминов: это β -структурный белок (содержащий по данным рентгеноструктурного анализа [2] ~40% β -структуры и ~10% α -спиралей), имеющий вдвое большую, чем α -лактальбумины, молекулярную массу и не содержащий в отличие от α -лактальбуминов дисульфидных связей. В работе Вонга и Хэмлина [3] было показано, что при $\text{pH } 3,6 \pm 0,2$ карбоангидраза В переходит в форму, не имеющую ферментативной активности и отличающуюся от нативной незначительным увеличением характеристической вязкости (4,1 вместо 3,7 $\text{см}^3/\text{г}$), существенным увеличением амплитуды спектра кругового дихроизма (КД) в дальней ультрафиолетовой области и практическим отсутствием спектра КД в ароматической области. Дальнейшее исследование этой формы, проведенное в нашей работе, приводит к выводу, что эта глобулярная "кислая" форма также находится в "расплавленном" состоянии и имеет близкую к нативной вторичную структуру.

Коммерческий препарат коровьей карбоангидразы В ("Serva feinbiochemika", ФРГ) очищали на целлюлозе DE-52 по методике, близкой к [4]. Гомогенность образца проверялась электрофорезом как в присутствии додецилсульфата натрия, так и без него. Исследование проводили при значениях $\text{pH } 3,6$ ("кислая" форма белка) и $\text{pH } 7,2-7,5$ ("нативная" форма). При микрокалориметрическом исследовании нативную форму белка изучали при $\text{pH } 10,5$, так как при нейтральных значениях pH белок агрегирует в момент плавления (энзиматическая активность карбоангидразы при $\text{pH } 10,5$ сохраняется). Инфракрасные спектры были получены по методике, описанной в работах [5, 6]. Водородный обмен исследовали по методике, изложенной в работе [7]. Микрокалориметрические исследования проводили на микрокалориметре ДАСМ-1М, как описано в работе [8].

Для сравнения вторичной структуры карбоангидразы в кислой и нативной формах мы использовали метод инфракрасной спектроскопии (ИК). Лиофильно высушенный белок растворяли в D_2O . Для увеличения степени дейтерообмена раствор нативной формы при $\text{pH}^* 7,5$ (здесь и далее pH^* означает прямое показание pH -метра)

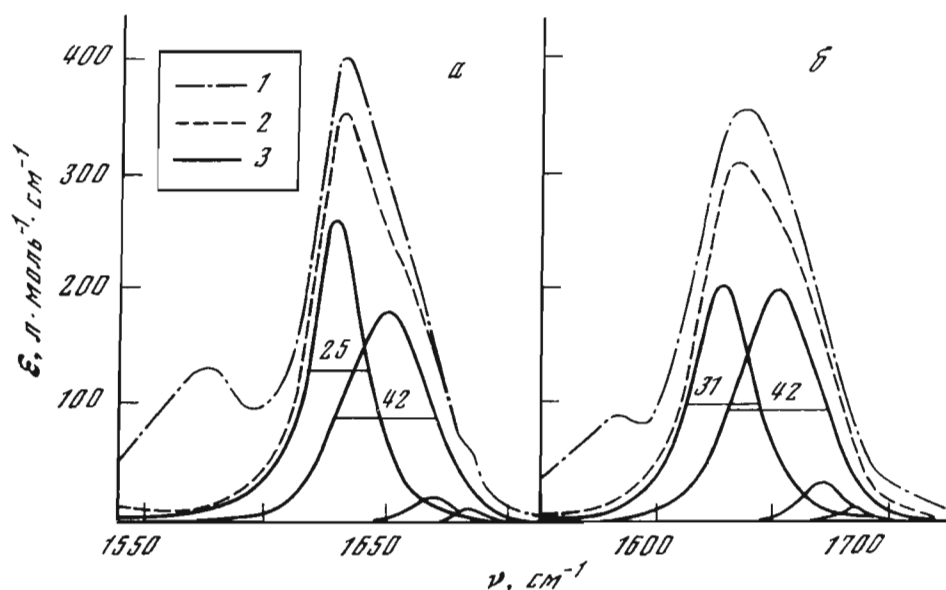


Рис. 1. Экспериментальные (1) и скорректированные на поглощение боковых групп аминокислотных остатков (2) инфракрасные спектры карбоангидразы В в нативной (а) и кислой (б) формах и их разложение на компоненты (3), соответствующие β -структуре и неупорядоченной структуре. Цифрами показана полуширина основных компонентов разложения (в см^{-1}). Объяснения в тексте

выдерживали при 56°C в течение 12 ч. Согласно [9] карбоангидраза при этой температуре сохраняет нативную структуру. Кислую форму белка при $\text{pH}^* 3,6$, получали путем подкисления раствора $0,1\text{ M}$ DCl и выдерживали при 26°C в течение 12 ч. В обоих случаях незамещенная часть составляла не более 7–10%.

На рис. 1 приведены экспериментальные ИК-спектры и спектры, скорректированные на поглощение боковых групп аминокислотных остатков по [10]. Скорректированные спектры разлагали на симметричные компоненты согласно [11]. В качестве начальных значений частот основных компонентов поглощения брали частоты 1630 и 1680 см^{-1} для β -структуры и 1647 и 1673 см^{-1} для неупорядоченной структуры [11]. Разложение спектра на составляющие получено путем вариации частоты максимумов, полуширины полос, поглощения в максимумах и формы контуров. Во всех случаях сходимость решения и его однозначность были достаточно хорошими. Различие между скорректированными экспериментальными кривыми и суммами составляющих компонент в рассматриваемой области не превышало 1–2% (рис. 1). В обеих формах белка значения частот неупорядоченной структуры составили 1653 и 1673 см^{-1} , что незначительно отличается от указанных выше начальных значений. В обеих формах карбоангидразы хорошо выражен основной компонент β -структуры около 1630 см^{-1} . Содержание (с точностью $\pm 5\%$) β -структуры и неупорядоченной структуры, оцененное из площадей соответствующих контуров поглощения, в нативной форме белка составляет соответственно 39 и 58%, а в кислой форме — 37 и 66%. Увеличение полуширины основного компонента β -структурой полосы в кислой форме белка связано, по-видимому, с некоторым разупорядочением β -структуры. Таким образом, кислая форма карбоангидразы мало отличается от ее нативной формы по содержанию β -структуры и неупорядоченной структуры, хотя, возможно, отличается от нее по степени упорядоченности β -структуры.

Этому выводу не противоречат и спектры КД карбоангидразы в дальней ультрафиолетовой области, полученные в работе [3] и воспроизведенные для нашего образца И.А. Болотиной (Институт молекулярной биологии АН СССР). Спектр КД кислой формы белка даже более выражен, чем спектр нативной формы, что свиде-

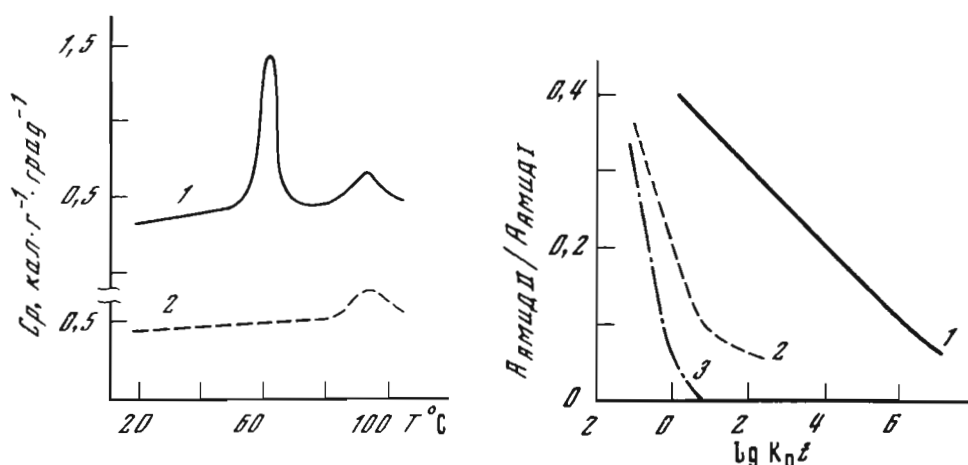


Рис. 2. Кривые микрокалориметрического плавления карбоангидразы В в нативной (1) и кислой (2) формах

Рис. 3. Кинетические кривые водородного обмена в пептидных NH-группах для карбоангидразы В в нативной (1) и кислой (2) формах. Для сравнения приведена кривая обмена окисленной рибонуклеазы (3). Кривая для нативной формы карбоангидразы взята из работы [13]

тельствует о сохранении в кислой форме значительного содержания вторичной структуры. Количественная интерпретация различий спектров КД кислой и нативной форм осложняется [3] вкладом ароматических боковых групп в спектр дальней ультрафиолетовой области [12], который может быть в этих формах существенно различным.

На рис. 2 приведены результаты микрокалориметрического исследования карбоангидразы. Из рисунка видно, что нативный белок обладает двумя четко разделенными пиками температурного плавления: при ~ 65 и ~ 95 °С. Оценки энтальпий плавления показывают, что с первым пиком плавится $\sim 75\%$ молекулы, со вторым — $\sim 25\%$. В то же время в кислой форме карбоангидразы первый пик отсутствует, т.е. основная часть молекулы карбоангидразы в кислой форме "расплавлена" уже при 10 °С.

На рис. 3 приведены кинетические кривые водородного обмена двух форм карбоангидразы в сравнении с кривой обмена окисленной рибонуклеазы А, которая обычно используется в качестве модели полностью развернутого белка. Из рисунка видно, что скорость обмена в кислой форме карбоангидразы значительно выше, чем в нативной форме, и приближается к скорости обмена в окисленной рибонуклеазе А. В то же время, в отличие от кислой формы α -лактальбумина [1], кривая обмена кислой формы карбоангидразы резко негомогенна: в этой форме сохраняется небольшая часть амидных групп ($\sim 20\%$), протоны которых остаются необменяющимися даже при очень больших временах. Это хорошо согласуется с результатами микрокалориметрического исследования карбоангидразы. По-видимому, необменявшиеся амидные группы соответствуют той части молекулы карбоангидразы, которая плавится при ~ 95 °С в нативной форме и сохраняет кооперативный пик плавления при рН 3,6. Результаты исследования дейтерообмена карбоангидразы позволяют также исключить альтернативную модель плавления белка, согласно которой первый пик плавления соответствует переходу в с е й молекулы белка в промежуточное состояние, а второй пик соответствует еще одному переходу в с е й молекулы, например в полностью развернутое состояние. Очевидно, в этом случае кривая дейтерообмена при рН 3,6 была бы гомогенной.

Таким образом, полученные нами данные вместе с данными, полученными в работе [3], показывают, что молекула карбоангидразы В в "кислой" форме (при рН 3,6) имеет близкую к нативной компактность (мы получили значение характерис-

тической вязкости кислой формы карбоангидразы $4,6 \text{ см}^3/\text{г}$, что в пределах погрешности опыта ($\pm 0,5 \text{ см}^3/\text{г}$) совпадает с данными работы [3]) и близкое к нативному содержание вторичной структуры, но не имеет специфического окружения ароматических групп, характерного для нативного состояния. При этом основная часть молекулы не плавится кооперативно при нагревании и обладает высокой скоростью деитерообмена.

Следовательно, по всем исследованным физическим параметрам кислая форма основной части молекулы карбоангидразы относится к тому же типу "промежуточного" состояния белковой молекулы ("расплавленная глобула" с вторичной структурой), которое было описано нами для α -лактальбумина [1]. Наличие сходного по своим физическим характеристикам "промежуточного" состояния в столь различных по своей структуре и функции белках, как α -лактальбумины и карбоангидраза, наводит на мысль, что в подобное состояние могут при определенных условиях переходить и другие глобулярные белки. Не исключена возможность, что молекулы α -лактальбумина [14] и карбоангидразы [15], а возможно, и других белков проходят через подобное "промежуточное" состояние в процессе своего сворачивания *in vitro* и что стадией, лимитирующей кинетику их сворачивания, является переход из этого "промежуточного" состояния в нативное.

Авторы благодарят И.А. Болотину за снятие спектров КД, А.П. Коломиец за помощь в препаративной работе и Т.Н. Цалкову за помощь в проведении микрокалориметрических исследований.

Институт белка
Академии наук СССР, Пущино Московской обл.
Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР, Москва

Поступило
12 IV 1983

ЛИТЕРАТУРА

1. Dolgikh D.A., Gilmanishin R.I., Brazhnikov E.V. et al. – FEBS Lett., 1981, vol. 136, p. 311–315.
2. Kannan K.K., Notstrand B., Fridborg K. et al. – Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, vol. 72, p. 51–55.
3. Wong K.-P., Hamlin L.M. – Biochemistry, 1974, vol. 13, p. 2678–2683.
4. Armstrong J.McD., Myers D.V., Verpoorte J.A., Edsall J.T. – J. Biol. Chem., 1966, vol. 241, p. 5137–5149.
5. Chirgadze Yu.N., Shestopalov B.V., Venyaminov S.Yu. – Biopolymers, 1973, vol. 12, p. 1337–1351.
6. Chirgadze Yu.N., Brazhnikov E.V. – Ibid., 1974, vol. 13, p. 1701–1712.
7. Abaturov L.V., Yakobashvily N.N., Jinoria K.Sh. et al. – FEBS Lett., 1976, vol. 70, p. 127–130.
8. Privalov P.L., Plotnikov V.V., Filimonov V.V. – J. Chem. Thermodyn., 1975, vol. 7, p. 41–47.
9. McCoy L.F., Wong K.-P. – Biochemistry, 1981, vol. 20, p. 3062–3067.
10. Chirgadze Yu.N., Fedorov O.V., Trushina N.P. – Biopolymers, 1975, vol. 14, p. 679–694.
11. Чиргадзе Ю.Н. Докт. дис., Ин-т белка АН СССР, Пущино, 1976.
12. Sears D.W., Beychok S. In: Physical principles and techniques of protein chemistry. Part C. N.Y.; L: Acad. Press, 1973, p. 445–593.
13. Zavodszky P., Johansen J.T., Hyidt A. – Europ. J. Biochem., 1975, vol. 56, p. 67–72.
14. Kuwajima K. – J. Mol. Biol., 1977, vol. 114, p. 241–258.
15. McCoy L.F., Rowe E.S., Wong K.-P. – Biochemistry, 1980, vol. 19, p. 4738–4743.