

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ГИБКОСТИ ОСНОВНОЙ ЦЕПИ БЕЛКА НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ АПОМИОГЛОБИНА

Мажорина М.А., Мельник Б.С.

Институт белка РАН

Ул. Институтская, 4, г. Пуццино, 142290, РФ; e-mail: MariaMazhorina@yandex.ru

Поступила в редакцию: 14.06.2018

Аннотация. Апомиоглобин – удобная модель для *in vitro* исследований сворачивания/разворачивания глобулярных белков. В данной работе представлены результаты кинетических исследований сворачивания/разворачивания мутантных форм апомиоглобина с заменами остатков пролина в двух его петлях на глицин (P37G и P120G), а также удлинение петли (в положении 120) на три и шесть остатков глицина (P120(3G) и P120(6G)). Для всех белков измерены кинетические кривые денатурации и ренатурации, рассчитаны константы скоростей сворачивания/разворачивания, построены их зависимости от концентрации денатуранта (шеvronные графики), рассчитаны свободные энергии всех состояний апомиоглобина. Полученные данные о кинетических свойствах мутантных форм апомиоглобина позволили изучить влияние гибкости и длины выбранных петель на энергетический профиль белка. В частности, показано, что все исследованные мутации дестабилизировали промежуточное состояние апомиоглобина относительно развернутого состояния.

Ключевые слова: апомиоглобин, сворачивание белка, триптофановая флуоресценция, эксперименты остановленного потока, шевронный график, энергетический профиль.

Апомиоглобин является удобной моделью для изучения сворачивания/разворачивания глобулярных белков *in vitro*. Этот небольшой альфа-спиральный белок с молекулярной массой 17 кДа содержит 153 аминокислотных остатка, 65 % из которых входят в состав α -спиралей [1]. На сегодняшний день апомиоглобин достаточно хорошо изучен. Многочисленные исследования позволили установить ряд основных характеристик этого белка. В частности, в процессе сворачивания апомиоглобина выделяют две стадии (быстрая и медленная фазы), первая из которых связана с очень быстрым формированием из развернутого состояния компактного промежуточного интермедиата типа расплавленной глобулы, обладающего гидрофобным ядром с нативоподобной спиральной структурой [2, 3]. Медленная, скорость – лимитирующая, фаза связана с переходом белка из расплавленной глобулы в нативное состояние [2]. Кинетические эксперименты, основанные на измерении флуоресценции триптофана с использованием приставки остановленного потока, не позволяют рассчитать скорость образования расплавленной глобулы, поскольку ее формирование происходит за «мертвое время» прибора (порядка нескольких микросекунд). В связи с этим, в нашей лаборатории разработан экспериментальный подход к анализу кинетических данных многостадийно сворачивающихся белков [2], который позволяет получать информацию о населенности промежуточного состояния белка в зависимости от концентрации денатуранта. Полученные с помощью такого подхода данные могут быть использованы для оценки стабильности состояния расплавленной глобулы.

Важно отметить тот факт, что кинетический интермедиат сворачивания апомиоглобина аналогичен по структуре расплавленной глобуле, наблюдаемой при pH 4.2 в равновесных экспериментах [3].

Кроме того, данные ЯМР-анализа указывают, что некоторые мутации способны изменить путь сворачивания апомиоглобина [4], что вызвано изменением структуры кинетического интермедиата сворачивания [5].

В предыдущих работах, выполненных в нашей лаборатории, сделаны систематические исследования по выяснению влияния разных видов мутаций на энергетический профиль апомиоглобина [2, 6-9]. Методами кругового дихроизма и флуоресценции установлено, что ни одна из более 20 исследованных одиночных замен аминокислотных остатков ни в ядре, ни на поверхности апомиоглобина существенно не изменила стабильность промежуточного состояния типа расплавленной глобулы [6, 8, 9]. Следует подчеркнуть, что это промежуточное состояние выявляется при сворачивании большинства белков. Поэтому знание о его стабильности и особенностях сворачивания необходимо для понимания самоорганизации большинства белковых молекул.

Возникает вопрос, а можно ли вообще какими-то мутациями повлиять на стабильность промежуточного состояния апомиоглобина?

Мы предположили, что такое влияние должны оказывать мутации, затрагивающие конформационные особенности белка, в частности, подвижность и компактность его структуры. Например, замены аминокислотных остатков в петлях, соединяющих элементы вторичной структуры апомиоглобина. Введение глицинов для «гибкости», а также удлинение петель за счет нескольких глицинов может повлиять на взаимодействие элементов вторичной структуры в состоянии расплавленной глобулы.

Для проверки этой гипотезы мы спроектировали мутации в апомиоглобине с заменой остатков пролина в двух его петлях (в 37 и 120 положении) на глицин (P37G, P120G), а также удлинение петли в районе 120 аминокислотного остатка на 3 и 6 остатков глицина (P120(3G), P120(6G)). Петля, в которой находится P120, расположена между спиралью, формирующимися при переходе апомиоглобина из развернутого состояния в

состояние расплавленной глобулы [3]. Петля, в которой находится P37, соединяет спирали, формирующиеся при переходе белка из состояния расплавленной глобулы в нативное состояние.

Экспериментальная часть. На основе плазмиды, несущей ген апомиоглобина дикого типа, были получены плазмиды, несущие гены мутантных форм апомиоглобина с выбранными заменами аминокислотных остатков. Рекомбинантные белки выделены и очищены в соответствии с методами, которые были применены нами в предыдущих работах [2, 6-9]. Влияние мутаций на структуру нативного состояния апомиоглобина оценивалось с помощью метода кругового дихроизма (КД) в дальней ультрафиолетовой (УФ) области. Слабое отличие спектров КД мутантных белков от спектра белка дикого типа свидетельствует о том, что введенные нами замены аминокислотных остатков практически не повлияли на структуру нативного состояния апомиоглобина (графики не приведены). Влияние указанных выше замен аминокислотных остатков на скорости сворачивания/разворачивания апомиоглобина при разных концентрациях мочевины изучали методом триптофановой флуоресценции, используя приставку остановленного потока. Для всех белков были получены кинетические кривые денатурации и ренатурации. Все измерения проводили при 11 °С с использованием 20 мМ натрий-фосфатного буфера при рН 6.2. Методика измерений подробно описана в наших предыдущих работах [2, 6-9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Напомним, что сворачивание апомиоглобина включает быструю и медленную (скорость-лимитирующую) фазы. Быстрая фаза сворачивания, соответствующая переходу белка из развернутого состояния в промежуточное состояние ($U \leftrightarrow I$), происходит за «мертвое время» прибора, вследствие чего ее скорость невозможно измерить. Получаемые экспериментально кривые сворачивания апомиоглобина позволяют рассчитать только константу скорости медленной фазы сворачивания, соответствующей переходу белка из промежуточного состояния (I) в нативное состояние (N). Для расчета видимых констант скоростей кинетические кривые медленной фазы сворачивания и разворачивания апомиоглобина аппроксимировались в программе Sigma Plot, согласно формуле (1):

$$y = A * \exp(-k_{app} * t) + C, \quad (1)$$

где k_{app} – значение видимых (apparent) констант скоростей сворачивания и разворачивания; A и C – параметры кривой; t – время реакции.

Рассчитав видимые константы скоростей, можно построить шевронные графики - зависимость логарифма видимых констант скоростей от концентрации денатуранта.

На рисунке 1 показаны шевронные графики апомиоглобина дикого типа и его мутантных форм.

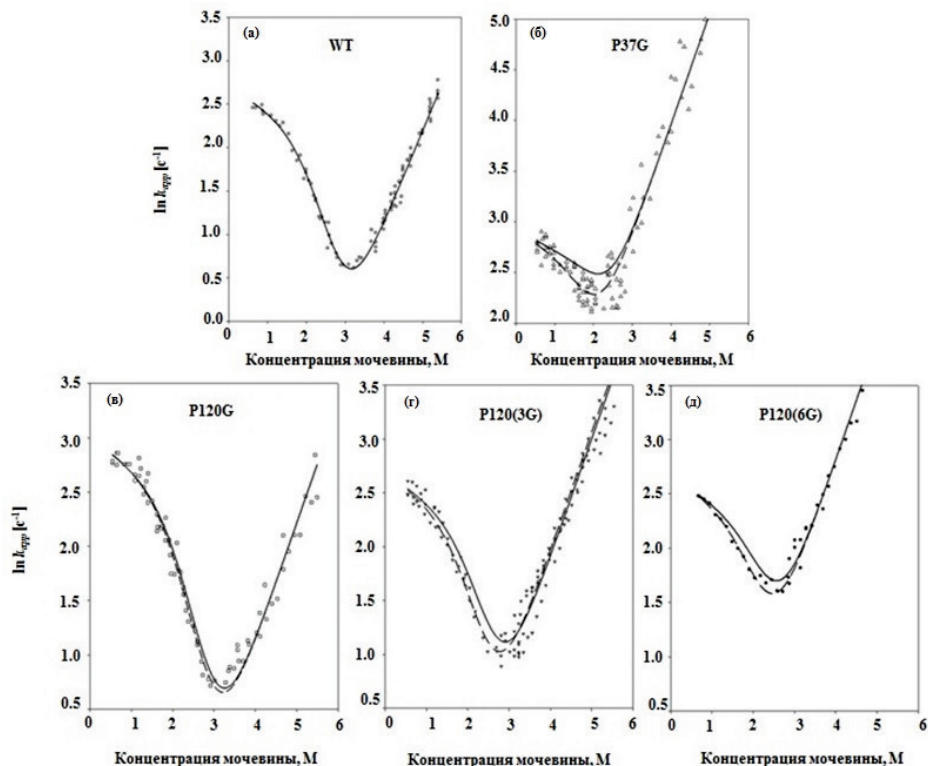


Рисунок 1. Шевронные графики зависимости видимой константы скорости сворачивания/разворачивания апомиоглобина дикого типа и исследуемых мутантных форм от концентрации денатуранта (обозначения на графиках)

Каждая точка на шевронных графиках соответствует натуральному логарифму видимой константы скорости сворачивания или разворачивания, рассчитанной по формуле (1), при данной концентрации мочевины.

Для белков с одностадийной схемой сворачивания, видимая константа скорости на шевронном графике равна сумме констант скоростей прямой и обратной реакции:

$$k_{app} = k_f + k_u, \quad (2)$$

где k_{app} – видимая константа скорости сворачивания и разворачивания; k_f – константа скорости сворачивания; k_u – константа скорости разворачивания.

В случае апомиоглобина (сворачивающегося с образованием одного промежуточного состояния) для учета влияния быстрой фазы сворачивания на последующую медленную фазу сворачивания необходимо ввести в формулу (2) дополнительный параметр F_I – населенность промежуточного состояния, принимающий значения от 0 до 1 [2]:

$$k_{app}(x) = k_f(x) * F_I(x) + k_u(x), \quad (3)$$

где $F_I(x)$ – населенность промежуточного состояния; x – концентрация мочевины.

В общем виде запишем уравнение, которое мы использовали для аппроксимации шевронных графиков:

$$y = \ln(k_f(x) * F_I(x) + k_u(x)), \quad (4)$$

здесь

$$k_f(x) = A_f * x + B_f, \quad (5)$$

$$k_u(x) = A_u * x + B_u, \quad (6)$$

$$F_I(x) = 1/(1 + \exp((X_i - x)/S_i)), \quad (7)$$

где A_f , B_f , A_u , B_u – параметры прямых, описывающих истинные значения констант скоростей медленной фазы сворачивания и разворачивания апомиоглобина, X_i и S_i – параметры S-образной кривой, описывающей населенность промежуточного состояния: X_i – середина сигмоиды, S_i – наклон сигмоиды [2].

Если предположить, что путь сворачивания мутантных форм апомиоглобина не изменился по сравнению с белком дикого типа, тогда при аппроксимации во всех шевронных графиках должен быть одинаковый наклон веток сворачивания (параметр A_f), одинаковый наклон веток разворачивания (параметр A_u) и одинаковые параметры населенности промежуточного состояния (X_i и S_i) [2]. Изменится только положение веток сворачивания и разворачивания (параметры B_f и B_u), которое достаточно точно определяется из эксперимента при низких и высоких концентрациях мочевины («вес» точек на краях шевронного графика больше, чем в середине). Таким образом, при аппроксимации шевронных графиков, мы используем достаточно много ограничений.

На рисунке 1 сплошной черной линией показана аппроксимация экспериментальных данных (шеvronных графиков) с вышеописанными ограничениями в уравнении. Видно, что для мутантных белков середина шевронных графиков описывается плохо. Самые большие отличия наблюдаются для белка с заменой пролина 37 на глицин (рис. 1(б)) и для белка с петлей в положении 120, удлиненной на шесть глицинов (рис. 1(д)). Такие отличия могут означать, что исследованные нами мутации повлияли именно на стабильность промежуточного состояния апомиоглобина относительно развернутого состояния.

Если «снять» ограничение параметра X_i , связанного со стабильностью промежуточного состояния, то все экспериментальные данные аппроксимируются очень хорошо (пунктирные линии на рисунке 1). Таким образом, можно сделать вывод, что исследованные мутации повлияли на стабильность промежуточного состояния апомиоглобина относительно развернутого состояния.

Аппроксимация шевронных графиков позволяет рассчитать параметры, которые позволяют построить профили свободной энергии, наглядно представляющие, на какие из состояний белка повлияла каждая из мутаций (рис. 2, 3).

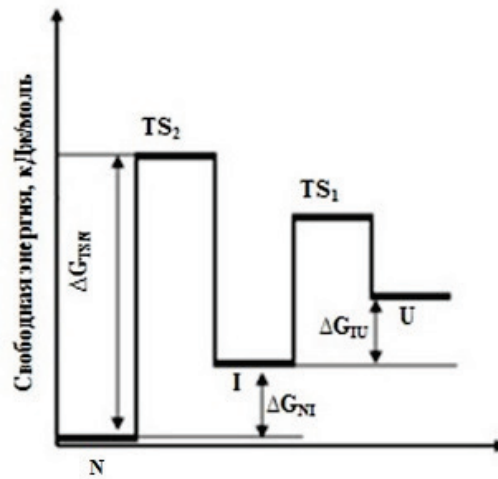


Рисунок 2. Схема профиля свободной энергии (N – нативное состояние белка, I – промежуточное состояние, U – развернутое состояние, TS₁ и TS₂ – первое и второе переходные состояния, ΔG_{TSN}, ΔG_{NI}, ΔG_{IU} – изменение свободной энергии)

Формулы для построения энергетического профиля:

$$\Delta G_{IU} = -RT \ln(F_I / (1 - F_I)), \quad (8)$$

$$\Delta G_{NI} = -RT \ln(k_f / k_u), \quad (9)$$

$$\Delta G_{TSN} = -RT [\ln(k_u) - \ln(RT/h)], \quad (10)$$

где F_I – населенность промежуточного состояния; k_f – константа скорости сворачивания; k_u – константа скорости разворачивания; R – универсальная газовая постоянная; T – температура в К; h – постоянная Планка.

На рисунке 3 обозначены экспериментально полученные профили свободной энергии апомиоглобина дикого типа и исследуемых мутантных форм в 2.1 М мочевины.

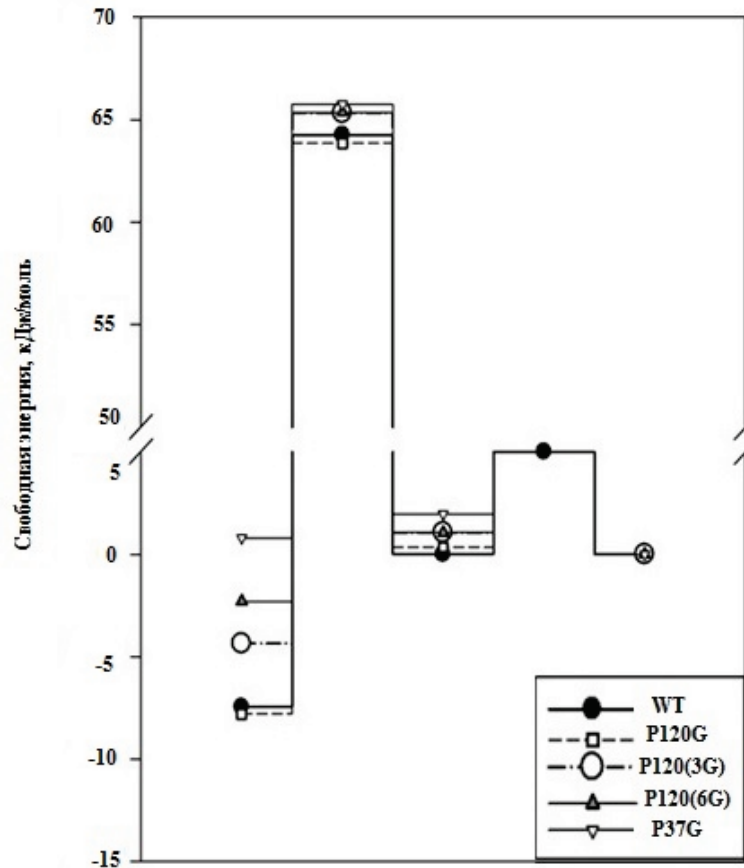


Рисунок 3. Профили свободной энергии апомиоглобина дикого типа и исследуемых мутантных форм

Видно, что исследованные мутантные формы апомиоглобина по-разному влияют на стабильность нативного и переходного состояний белка, но все они в той или иной степени дестабилизируют промежуточное состояние относительно развернутого состояния белка.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

Нами было изучено сворачивание/разворачивание мутантных форм апомиоглобина с заменами остатков пролина в двух его петлях на глицин (P37G и P120G), а также удлинение петли (в положении 120) на три и шесть остатков глицина (P120(3G) и P120(6G)). Для всех мутантных форм белка были построены шевронные графики (зависимость видимых констант скоростей денатурации и ренатурации от концентрации денатуранта) и рассчитаны свободные энергии нативного, переходного и промежуточного состояний. Результаты проведенных экспериментов показали, что исследованные мутации, введенные в петли, соединяющие элементы вторичной структуры апомиоглобина, дестабилизируют состояние расплавленной глобулы белка относительно развернутого состояния.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-34-00307 мол_а.

Список литературы / References:

1. Gast K., Damaschun H., Misselwitz R., Muller-Frohne M., Zirwer D., Damaschun G. Compactness of protein molten globules: temperature-induced structural changes of the apomyoglobin folding intermediate. *Eur. Biophys. J.*, 1994, vol. 23, pp. 297-305.
2. Baryshnikova E.N., Sharapov M.G., Kashparov I.A., Ilyina N.B., Bychkova V.E. Investigation of apomyoglobin stability depending on urea and temperature at two different pH values. *J. Mol. Biol.*, 2005, vol. 39, pp. 292-297.
3. Jennings P.A., Wright P.E. Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin. *Science*, 1993, vol. 262, pp. 892-896.
4. Garcia C., Nishimura Ch., Cavagnero S., Dyson H.J., Wright P.E. Changes in the apomyoglobin pathway caused by mutation in the distal histidine residue. *Biochemistry*, 2000, vol. 39, pp. 11227-11237.
5. Nishimura C., Dyson H.J., Wright P.E. Identification of native and non-native structure in kinetic folding intermediates of apomyoglobin. *J. Mol. Biol.*, 2006, vol. 355, pp. 139-156.
6. Samatova E.N., Katina N.S., Balobanov V.A., Melnik B.S., Dolgikh D.A., Bychkova V.E., Finkelstein A.V. How strong are side chain interactions in the folding intermediate? *Protein Sci.*, 2009, vol. 18, pp. 2152-2159.
7. Samatova E.N., Melnik B.S., Balobanov V.A., Katina N.S., Dolgikh D.A., Semisotnov G.V., Finkelstein A.V., Bychkova V.E. Folding intermediate and folding nucleus for I-N and U-I-N transitions in apomyoglobin: contributions by conserved and nonconserved residues. *Biophys. J.*, 2010, vol. 98, pp. 1694-1702.
8. Melnik T.N., Majorina M.A., Larina D.S., Kashparov I.A., Samatova E.N., Glukhov A.S., Melnik B.S. Independent of Their Localization in Protein the Hydrophobic Amino Acid Residues Have No Effect on the Molten Globule State of Apomyoglobin and the Disulfide Bond on the Surface of Apomyoglobin Stabilizes This Intermediate State. *Plos. one*, 2014, vol. 9, e98645.
9. Мажорина М.А., Глухова К.А., Марченков В.В., Мельник Б.С. Влияние аминокислотных замен на поверхности апомиоглобина на энергетический профиль белка. *Молекулярная биология*, 2018, т. 52, № 1, с. 62-72. [Majorina M.A., Glukhova K.A., Marchenkov V.V., Melnik B.S. Effect of substitutions in surface amino acids on energy profile of apomyoglobin. *Molecular biology*, 2018, vol. 52, no. 1, pp. 62-72 (In Russ.)]

STUDIES OF THE EFFECT OF FLEXIBILITY OF THE POLYPEPTIDE CHAIN OF PROTEIN ON THE ENERGY PROFILE OF APOMYOGLOBIN

Majorina M.A., Melnik B.S.

Institute of protein research, Russian Academy of Sciences

Institutskaya str., 4, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: MariaMazhorina@yandex.ru

Abstract. Apomyoglobin is a convenient model for in vitro studies of folding/unfolding of globular proteins. Herein we describe the results of kinetic studies of folding/unfolding of mutant forms of apomyoglobin with substitutions of proline residues on its two loops (P37G and P120G) by glycine as well as loop extension in position 120 by three and six glycine residues (P120(3G) and P120(6G)). For all proteins, we measured kinetic denaturation and renaturation curves, calculated rate constants of folding/unfolding, plotted their dependences on the denaturant concentration (chevron plots) and computed free energies of all states of apomyoglobin. The obtained data on the kinetic properties of mutant forms of apomyoglobin allowed us to analyze the effect of flexibility and length of chosen loops on the energy profile of the protein. Specifically, it was demonstrated that the studied mutations destabilized the intermediate state of apomyoglobin as compared to the unfolded state.

Key words: *apomyoglobin, protein folding; tryptophan fluorescence, stopped-flow experiments, chevron plot, energy profile.*