

## СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И СТАБИЛЬНОСТЬ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ СОСТОЯНИЙ КАРБОКСИАНГИДРАЗЫ

Катина Н.С.<sup>1</sup>, Балобанов В.А.<sup>1</sup>, Ильина Н.Б.<sup>1</sup>, Маркелова Н.Ю.<sup>2</sup>, Кашпаров И.А.<sup>1</sup>,  
Марченков В.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пуццоно, 142290, РФ

<sup>2</sup> Институт биофизики клетки РАН

ул. Институтская, 3, г. Пуццоно, 142290, РФ; e-mail: delfinium27@rambler.ru

Поступила в редакцию: 02.07.2018.

**Аннотация.** Карбоксиангидраза представляет собой однодоменный глобулярный белок, в нативном состоянии которого преобладает  $\beta$ -структура. В данной работе проведено исследование равновесного разворачивания апоформы карбоксиангидразы понижением pH. Показано, что денатурация белка кислым pH представляет собой переход между тремя состояниями  $N \rightarrow I_1 \rightarrow I_2$ . Добавление мочевины к  $I_2$  приводит к его разворачиванию до развернутого состояния  $I_2 \rightarrow U$ . С помощью аппроксимации переходов равновесного разворачивания белка понижением pH и мочевиной удалось провести оценку стабильностей нативного и двух промежуточных состояний карбоксиангидразы. Описанный подход может быть использован в дальнейшем для исследования влияния аминокислотных замен на сворачивание данного белка. Также в работе были исследованы структурные особенности конформационных состояний карбоксиангидразы, полученные результаты позволили сделать вывод, что состояние  $I_1$  находится в составе ассоциатов и содержит ненативные  $\alpha$ -спиральные участки.

**Ключевые слова:** карбоксиангидраза, сворачивание белка, промежуточное состояние, равновесное разворачивание, круговой дихроизм.

### ВВЕДЕНИЕ

Сразу после синтеза на рибосоме полипептидная цепь сворачивается в нативное состояние, в котором белок выполняет свою функцию [1]. В последние десятилетия были сделаны ключевые открытия в области исследования процесса сворачивания белков, которые позволили выявить основные закономерности самоорганизации полипептидной цепи [2-5]. Показано, что сворачивание большинства белков происходит с формированием одного или нескольких промежуточных состояний [6, 7]. Промежуточные состояния белка представляют собой компактные стабильные состояния белковой молекулы, которые накапливаются в процессе сворачивания [7,8]. Позже было показано, что промежуточные состояния белков в большинстве случаев являются предшественниками амилоидов, образование которых в организме человека связано с развитием ряда тяжелых неизлечимых заболеваний [9, 10]. В связи с этим, исследование структуры промежуточных состояний белков и выяснение взаимосвязи процессов сворачивания и агрегации представляют собой важные направления современных исследований молекулярной биологии и биофизики.

Первым подробно охарактеризованным промежуточным состоянием было состояние расплавленной глобулы (MG) [11, 12]. Для него характерно наличие большей части нативной вторичной структуры при отсутствии плотной упаковки боковых групп [13, 14]. Позднее было показано, что сворачивание некоторых белков проходит через формирование нескольких промежуточных состояний, и был охарактеризован новый тип промежуточного состояния - предрасплавленная глобула (PMG), которое формируется на ранних стадиях сворачивания [13, 15, 16]. Таким образом, на первых стадиях сворачивания образуются элементы вторичной структуры, которые флуктуируют (PMG), затем эти элементы формируют компактное состояние с нативоподобной вторичной структурой (MG), на последней стадии сворачивания образуется уникальная нативная структура с плотной упаковкой боковых групп (N) [17].

Важным является вопрос о роли промежуточных состояний в процессе сворачивания белков. Показано, что наличие промежуточного состояния может привести к ускорению сворачивания белка благодаря тому, что фиксация частично свернутого состояния облегчает для полипептидной цепи поиск нативной конформации [18]. Оказалось, что помимо нативных контактов, в структуре промежуточных состояний может присутствовать доля ненативных взаимодействий. Например, при сворачивании некоторых  $\beta$ -белков в промежуточном состоянии образуются  $\alpha$ -спирали, которые позднее трансформируются в  $\beta$ -структуру [19, 20]. Причем наличие ненативных взаимодействий в структуре промежуточных состояний приводит к ускорению процесса сворачивания [21, 22]. Эти результаты говорят о том, что сворачивание белка – это не просто постепенное увеличение количества контактов, а образование ненативных взаимодействий также важно для приобретения белком нативной конформации.

К настоящему времени сворачивание белков с накоплением одного промежуточного состояния достаточно подробно описано [23, 24]. Однако сворачивание многостадийных белков остается недостаточно изученным, а исследованию их агрегации посвящены лишь единичные работы [25, 26].

Целью данной работы было исследование структурных характеристик и стабильности конформационных

состояний многостадийно сворачивающегося белка на примере карбоксиангидразы. Карбоксиангидраза представляет собой фермент, содержащий цинк в качестве кофактора. Белок катализирует обратимую реакцию гидратации двуокиси углерода. Карбоксиангидраза – однодоменный белок с молекулярной массой 29 кДа [27]. Вторичная структура представлена двумя  $\beta$ -шпильками,  $\alpha\beta$ -шпилькой и  $\beta$ -листом [28].

Карбоксиангидраза длительное время является классической моделью для исследования сворачивания многостадийных белков. Исследования равновесного разворачивания карбоксиангидразы показали, что сворачивание этого белка происходит с формированием как минимум двух промежуточных состояний [29-32]. По результатам кинетических экспериментов рассчитаны величины свободной энергии конформационных состояний белка, а также высота энергетических барьеров между ними [33, 34]. В последние годы также были начаты исследования амилоидообразования карбоксиангидразы. Для исследований агрегации используют апоформу карбоксиангидразы, то есть белок, не содержащий ионы цинка [25, 26]. В связи с тем, что цинк стабилизирует белок и способствует рефолдингу, то исследования агрегации удобно проводить в отсутствие ионов металлов [35]. Однако к настоящему времени в литературе отсутствуют исследования особенностей сворачивания апоформы карбоксиангидразы и структуры ее промежуточных состояний.

В данной работе проведено исследование равновесного разворачивания апоформы карбоксиангидразы понижением pH. Показано, что денатурация белка кислым pH представляет собой переход между тремя состояниями  $N \rightarrow I_1 \rightarrow I_2$ , при этом наблюдается практически полное накопление каждого конформационного состояния. Добавление мочевины к состоянию  $I_2$  приводит к разворачиванию белка. С помощью аппроксимации переходов равновесного разворачивания белка понижением pH и мочевиной была проведена оценка стабильности нативного и двух промежуточных состояний карбоксиангидразы. Структурные характеристики промежуточных состояний были исследованы методами кругового дихроизма (КД) в дальней и ближней ультрафиолетовой (УФ) области, а также методом динамического рассеяния света, степень экспонированности гидрофобных групп на растворитель была оценена по интенсивности флуоресценции АНС. Полученные результаты свидетельствуют о том, что состояние  $I_1$  присутствует в составе ассоциатов и содержит ненативные  $\alpha$ -спиральные участки. Вероятно, на последней стадии сворачивания белка часть  $\alpha$ -спиралей промежуточного состояния подвергается конформационным перестройкам и участвует в формировании  $\beta$ -структуры нативного состояния. Таким образом, полученные данные позволили получить новую информацию о сворачивании апоформы карбоксиангидразы, а также о структурных особенностях и стабильности промежуточных состояний белка.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Экспрессия и очистка белка.

Плазмида pET-11c\_joe, содержащая ген бычьей карбоксиангидразы II, была экспрессирована в клетках *E. coli* (штамм BL21 Star DE3) при температуре 37°C. Разрушение клеточных стенок проводили с использованием ультразвукового дезинтегратора Digital sonifier (Branson, США) в течение 5 минут в буфере 20 мМ этаноламин pH 9,2, содержащем 0,5 М PMSF, 20 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол и 1 мМ ЭДТА для ингибирования протеаз. Полученный раствор центрифугировали со скоростью 30000 об/мин в течение 30 минут. Для осаждения нуклеиновых кислот к полученному супернатанту добавляли стрептомицин до конечной концентрации 20 мМ и инкубировали 30 минут при перемешивании. Затем раствор центрифугировали со скоростью 30000 об/мин в течение 30 минут.

Очистку белка проводили при помощи ионообменной хроматографии на колонке monoQ Nitrap с использованием системы АКТА (Fisher Scientific, США). Колонку уравнивали буфером 20 мМ этаноламин pH 9,2, перед нанесением на колонку препарат карбоксиангидразы переводили в данный буфер посредством диализа. Элюцию проводили линейным градиентом концентрации NaCl от 0 до 1 М. Затем для получения апоформы карбоксиангидразы в белок добавляли мочевины до конечной концентрации 6 М и ЭДТА до конечной концентрации 5 мМ. Раствор инкубировали 2 часа при комнатной температуре, белок ренатурировали градиентным диализом в буфер 50 мМ трис-HCl pH 8, содержащий 500 мМ NaCl. Затем в данном буфере проводили гель-хроматографию на носителе Sephacril S-200 с использованием системы HPLC ProStar (Varian, США). Чистоту белка на каждой стадии очистки контролировали с помощью электрофореза в 15 % полиакриламидном геле в присутствии SDS [36]. Фракции, содержащие карбоксиангидразу, диализовали в 5 мМ бикарбонат аммония pH 8, и лиофильно высушивали с использованием лиофилизатора VirTis K5 (SP Scientific, США).

### Подготовка образцов для исследования равновесного разворачивания.

Для исследования равновесного разворачивания карбоксиангидразы кислым pH готовили раствор белка с концентрацией 1 мг/мл в 50 мМ фосфат-цитратном буфере pH 5,6. Затем аликвоты этого раствора в объемном соотношении 1/10 добавляли в буферные растворы в диапазоне pH от 5,6 до 2 (значения pH ниже 2,6 достигали добавлением в буфер соответствующего количества HCl). Значения pH полученных образцов измеряли с использованием pH-метра FiveEasy (Mettler Toledo, США). Перед измерениями образцы инкубировали в течение 24 часов при комнатной температуре.

Для исследования равновесного разворачивания карбоксиангидразы мочевиной готовили раствор белка с концентрацией 1 мг/мл в буфере 50 мМ глицин-HCl pH 2,4. Затем аликвоты этого раствора в объемном соотношении 1/10 добавляли в буферные растворы с концентрацией мочевины в диапазоне 0-6 М. Перед измерениями образцы инкубировали в течение 24 часов при комнатной температуре.

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 280 нм. Коэффициент экстинкции равный 1,72 был рассчитан теоретически [37].

#### Круговой дихроизм.

Измерение спектров КД проводили на спектрополяриметре Chirascan (Photophysics, Англия). Для измерений спектров в дальней УФ области использовали кювету с длиной оптического пути 1 мм, концентрация белка составляла 0,1 мг/мл. Для измерений спектров в ближней УФ области использовали кювету с длиной оптического пути 0,1 мм, концентрация белка составляла 1 мг/мл. Все измерения проводили при температуре 25°C.

Молярная эллиптичность  $[\theta]$  вычислялась по формуле:  $[\theta] = \frac{\theta_\lambda \times MRW}{l \times c}$ , где  $\theta_\lambda$  – измеряемая величина эллиптичности на длине волны  $\lambda$  (мград);  $MRW$  – средний молекулярный вес остатка, вычисленный из аминокислотной последовательности;  $l$  – длина оптического пути (мм);  $c$  – концентрация белка (мг/мл).

#### Флуоресценция.

Измерение спектров флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies, США) с использованием кюветы с оптическим путем 3×3 мм при температуре 25°C. Для измерения спектров триптофановой флуоресценции концентрация белка была равна 0,1 мг/мл. Длина волны возбуждения составляла 293 нм, спектр регистрировали в диапазоне 300-450 нм.

Для измерения спектров флуоресценции АНС концентрация белка была равна 0,1 мг/мл (3,5 мкМ), молярное соотношение белок/краситель составляло 1/4. Длина волны возбуждения составляла 360 нм, спектр регистрировали в диапазоне 400-600 нм.

#### Динамическое рассеяние света.

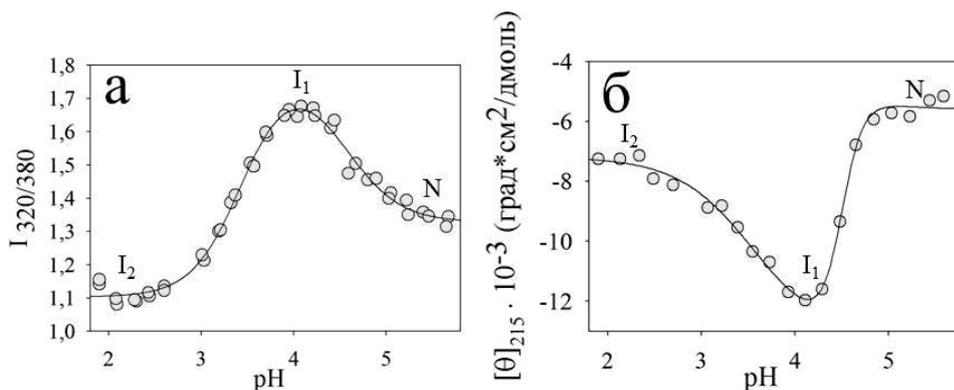
Измерение динамического рассеяния света было проведено с использованием прибора Zetasizer nano ZSP (Malvern, Великобритания) при температуре 25°C. Перед измерениями образцы центрифугировали 30 минут со скоростью 90000 об/мин на ультрацентрифуге Beckman 100 (Beckman Coulter, США). При расчете гидродинамического радиуса для образца, растворенного в 6М мочевины, использовали значение вязкости раствора, рассчитанное по формуле из работы [38].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

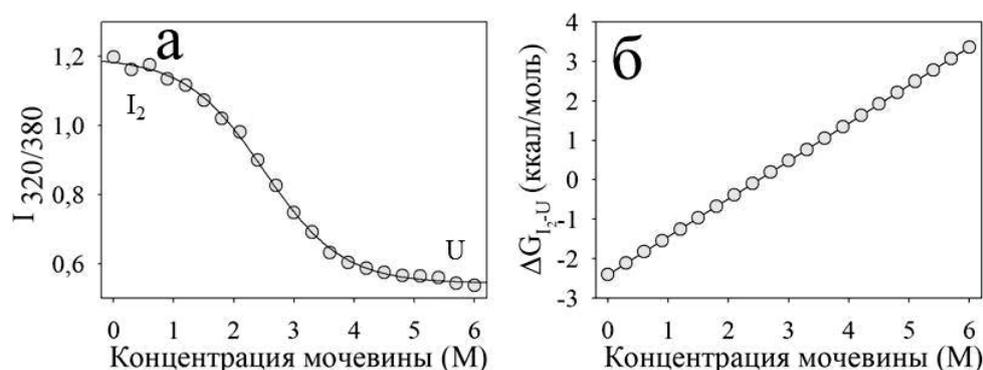
### Исследование равновесного разворачивания карбоксиангидразы.

*Переходы равновесного разворачивания.* В большинстве случаев при денатурации белков в растворе присутствует смесь молекул в различных конформационных состояниях, что затрудняет исследование структурных особенностей и стабильности промежуточных состояний белков. В связи с этим для подробного исследования промежуточных состояний важно подобрать такой тип денатурации, при котором наблюдается 100%-ное накопление каждого состояния. Для бычьей карбоксиангидразы показано, что при ее разворачивании мочевиной и гуанидингидрохлоридом не наблюдается полного накопления промежуточных состояний [15, 33]. В связи с этим в данной работе было исследовано равновесное разворачивание кислым рН, которое представляет собой менее жесткий тип денатурации.

Структурные изменения при денатурации карбоксиангидразы регистрировали методами триптофановой флуоресценции и КД в дальней УФ области. На рисунке 1 представлены переходы равновесного разворачивания белка понижением рН, построенные по изменению отношения интенсивностей флуоресценции на длинах волн 320/380 нм, а также молярной эллиптичности на длине волны 215 нм, так как минимум в данной области характерен для спектров  $\beta$ -структурных белков. По рисункам видно, что разворачивание карбоксиангидразы кислым рН представляет собой переход между тремя состояниями. При рН 5,6-4,8 белок находится в нативном состоянии N, при рН 3,9-4,3 наблюдается накопление промежуточного состояния I<sub>1</sub>, при рН 2-2,6 белок находится в состоянии I<sub>2</sub>. Значение молярной эллиптичности состояния I<sub>2</sub> на длине волны 215 нм составляет  $7 \cdot 10^{-3}$  град·см<sup>2</sup>/дмоль, это свидетельствует о том, что данное состояние не является развернутым и сохраняет значительную часть вторичной структуры.



**Рисунок 1.** Переходы равновесного разворачивания карбоксиангидразы понижением рН, регистрируемые методом триптофановой флуоресценции (а) и КД в дальней УФ области (б)



**Рисунок 2.** Переход равновесного разворачивания карбоксиангидразы мочевиной при pH 2,4, регистрируемый методом триптофановой флуоресценции (а); зависимость свободной энергии состояния I<sub>2</sub> относительно развернутого состояния от концентрации мочевины (б)

Для оценки стабильности состояния I<sub>2</sub> было проведено его равновесное разворачивание мочевиной при pH 2,4, полученный переход, построенный по изменению отношения интенсивностей флуоресценции на длинах волн 320/380 нм, представлен на рисунке 2а.

*Оценка стабильности конформационных состояний карбоксиангидразы.* В качестве меры стабильности конформационных состояний белков обычно используют значение свободной энергии ΔG. Однако зависимость ΔG(pH) различна для каждого белка, и определяется значениями pK его заряженных аминокислотных остатков, в связи с этим достоверное построение данной зависимости является затруднительным [39, 40]. Поэтому в качестве меры стабильности конформационных состояний белков при денатурации понижением pH удобно использовать значения средин переходов. Значения средин переходов C<sub>1/2</sub> (ед. pH) для переходов N-I<sub>1</sub> и I<sub>1</sub>-I<sub>2</sub> были получены из аппроксимации кривых равновесного разворачивания понижением pH функцией суммы двух сигмоид. Полученные значения для денатурационных кривых, регистрируемых методами триптофановой флуоресценции и КД, представлены в таблице 1.

В отличие от зависимости ΔG от pH, зависимость ΔG от концентрации мочевины является линейной, что позволяет достоверно рассчитать значение ΔG (I<sub>2</sub> → U) по результатам равновесного разворачивания состояния I<sub>2</sub> мочевиной. Для расчета термодинамических параметров состояния I<sub>2</sub> кривая равновесного разворачивания карбоксиангидразы мочевиной при pH 2,4 была аппроксимирована по модели двух состояний [41, 42] с использованием следующих формул:

$$\begin{aligned}
 F &= i_2 - f_u \times (i_2 - u) \\
 f_{i_2} &= I - f_u \\
 f_u &= \frac{k}{1+k} \\
 k &= \exp \frac{-(G_0 + m \cdot x)}{RT},
 \end{aligned}$$

где F – функция аппроксимации; f<sub>i<sub>2</sub></sub> и f<sub>u</sub> – доли состояний I<sub>2</sub> и U, соответственно; i<sub>2</sub> и u – значение регистрируемого параметра (отношение интенсивностей флуоресценции I<sub>320/380</sub>) состояний I<sub>2</sub> и U, соответственно; k – константа равновесия; G<sub>0</sub> – значение ΔG при концентрации мочевины равной 0 (ккал/моль); m – параметр, характеризующий корпоративности перехода между состояниями (ккал/моль/моль); x – концентрация мочевины (моль); R – газовая постоянная (ккал/моль/К); T – температура (К).

По результатам аппроксимации были получены значения m и G<sub>0</sub>, исходя из которых, были рассчитаны значение середины перехода C<sub>1/2</sub> (моль) по формуле C<sub>1/2</sub> =  $\frac{-G_0}{m}$ , а также значение свободной энергии состояния I<sub>2</sub> относительно развернутого состояния ΔG<sub>I<sub>2</sub>-U</sub> (ккал/моль) по формуле ΔG<sub>I<sub>2</sub>-U</sub> = G<sub>0</sub> + m·x. Полученные значения указаны в таблице 2. На рисунке 2б представлен график зависимости свободной энергии состояния I<sub>2</sub> относительно развернутого состояния от концентрации мочевины.

**Таблица 1.** Значения средин переходов N-I<sub>1</sub> и I<sub>1</sub>-I<sub>2</sub> карбоксиангидразы, рассчитанные по результатам денатурации белка понижением pH. Погрешность рассчитана по результатам двух независимых измерений

Переход	C <sub>1/2</sub> (ед. pH)	
	Флуоресценция	КД
N-I <sub>1</sub>	4,57 ± 0,01	4,51 ± 0,01
I <sub>1</sub> -I <sub>2</sub>	3,43 ± 0,01	3,60 ± 0,04

**Таблица 2.** Термодинамические параметры карбоксиангидразы, рассчитанные по результатам равновесного разворачивания белка мочевиной при pH 2,4. Погрешность рассчитана по результатам двух независимых измерений

Переход	$C_{1/2}$ (моль)	$\Delta G_{I_2-U}$ (ккал/моль)	$m$ (ккал/моль/моль)
I <sub>2</sub> -U	2,50 ± 0,07	-2,40 ± 0,18	0,96 ± 0,05

### Исследование структурных характеристик конформационных состояний карбоксиангидразы.

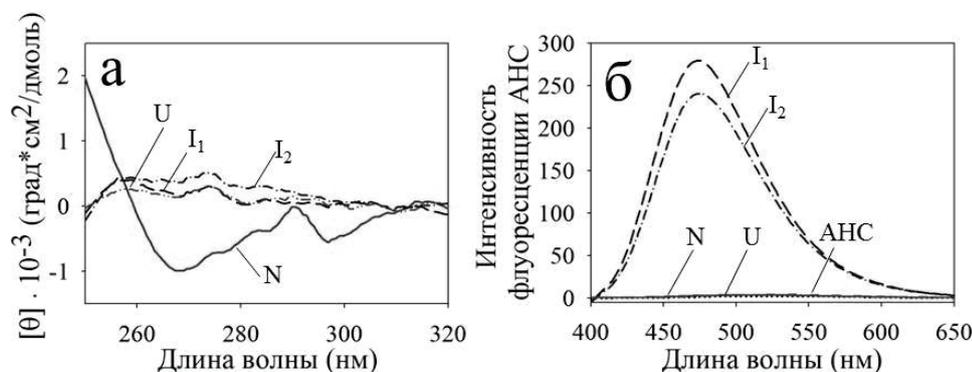
Данные равновесного разворачивания позволили определить условия, при которых наблюдается практически полное накопление четырех конформационных состояний карбоксиангидразы: pH 5,5 – состояние N, pH 4 – состояние I<sub>1</sub>, pH 2,4 – состояние I<sub>2</sub>, pH 2,4 и 6 M мочевины – состояние U. В данных условиях были исследованы вторичная и третичная структура, а также определены гидродинамический радиус и экспонированность гидрофобных групп на растворитель всех описанных состояний.

**Третичная структура конформационных состояний карбоксиангидразы.** Для определения наличия третичной структуры конформационных состояний карбоксиангидразы был использован метод КД в ближней УФ области. Данные спектры отражают асимметричность окружения ароматических боковых групп аминокислотных остатков, которая характерна для белка, содержащего третичную структуру. Каждый ароматический аминокислотных остаток характеризуется пиком в определенном диапазоне длин волн, соответственно на спектре присутствует несколько пиков, интенсивность которых зависит от плотности окружения боковых групп, их количества и других факторов [43]. На рисунке 3а представлены спектры КД в ближней УФ области нативного, промежуточных и развернутого состояний карбоксиангидразы. Спектр нативного состояния карбоксиангидразы свидетельствует о наличии в белке выраженной третичной структуры в данных условиях. Спектры состояний I<sub>1</sub> и I<sub>2</sub> близки к спектру развернутого состояния и свидетельствуют о том, что в промежуточных состояниях карбоксиангидразы третичная структура практически отсутствует.

**Экспонированность гидрофобных групп на растворитель.** Для характеристики экспонированности гидрофобных групп в белках используют флуоресцентный краситель АНС. АНС не связывается с гидрофобными группами, которые плотно упакованы в структуре нативного состояния, а также не взаимодействует с развернутым состоянием белков. Средство АНС высоко к молекулам белка, содержащим значительную часть вторичной структуры, но без плотной упаковки боковых групп [44]. В данной работе исследовано связывание АНС с конформационными состояниями карбоксиангидразы (рис. 3б). Видно, что нативное и развернутое состояния белка не связывают краситель, тогда как промежуточные состояния связывают АНС, что проявляется в возрастании его флуоресценции. Кроме того, интенсивность флуоресценции несколько ниже для состояния I<sub>2</sub> по сравнению с I<sub>1</sub>.

**Оценка гидродинамического радиуса.** Гидродинамический радиус конформационных состояний карбоксиангидразы был определен по данным динамического рассеяния света, полученные результаты представлены в таблице 3. Гидродинамический радиус нативного и развернутого состояний равен 23,5 Å и 50,3 Å, соответственно, что хорошо согласуется со значениями, полученными для данного белка ранее при исследовании его разворачивания гуанидингидрохлоридом [29]. Неожиданным оказалось значение гидродинамического радиуса состояния I<sub>1</sub>, равное 123,5 Å, что существенно превышает значение для развернутого белка. Это свидетельствует о том, что состояние I<sub>1</sub> при pH 4 формирует ассоциаты.

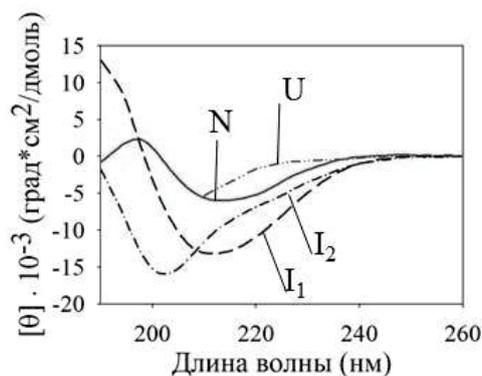
**Исследование вторичной структуры конформационных состояний карбоксиангидразы.** Оценка содержания элементов вторичной структуры конформационных состояний карбоксиангидразы была проведена по данным КД в дальней УФ области (рис. 4). В связи с недостоверным измерением КД в области длин волн ниже 210 нм для растворов мочевины, на рисунке спектр развернутого состояния белка представлен в диапазоне 210-260 нм.



**Рисунок 3.** Характеристики конформационных состояний карбоксиангидразы: спектры КД в ближней УФ области (а), спектры флуоресценции АНС, в качестве контроля представлен спектр свободного красителя (б)

**Таблица 3.** Гидродинамический радиус ( $R_h$ ) конформационных состояний карбоксиангидразы. Погрешность рассчитана по результатам трех измерений

Состояние	$R_h, \text{Å}$
N	$23,5 \pm 2,0$
I <sub>1</sub>	$123,5 \pm 18,0$
I <sub>2</sub>	$62,0 \pm 7,5$
U	$50,3 \pm 0,7$



**Рисунок 4.** Спектры КД в дальней УФ области конформационных состояний карбоксиангидразы

Спектры КД нативного и промежуточных состояний белка были обчислены с помощью алгоритма K<sub>2</sub>D, что позволило оценить процентное содержание элементов вторичной структуры конформационных состояний карбоксиангидразы (табл. 4) [45]. Исходя из полученных результатов можно сделать вывод, что содержание α-спиралей в состоянии I<sub>1</sub> существенно выше по сравнению с нативным состоянием белка, это свидетельствует о наличии ненативной спиральной структуры в промежуточном состоянии карбоксиангидразы.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По результатам равновесного разворачивания апоформы карбоксиангидразы, проведенным в данной работе, были определены значения pH, при которых наблюдается практически полное накопление нативного (N) и двух промежуточных состояний белка (I<sub>1</sub> и I<sub>2</sub>). Это позволило исследовать структурные особенности промежуточных состояний, а также оценить стабильность состояний N и I<sub>1</sub>. Для исследования стабильности состояния I<sub>2</sub> было проведено его разворачивание мочевиной до развернутого состояния. Таким образом, совместное исследование равновесного разворачивания белка понижением pH и мочевиной позволило охарактеризовать структурные свойства и стабильность нативного и двух промежуточных состояний карбоксиангидразы, описанный подход может быть использован в дальнейшем для исследования влияния аминокислотных замен на сворачивание данного белка.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что состояние I<sub>1</sub> при pH 4 находится в составе ассоциатов и содержит ненативные α-спирали. Ассоциация промежуточных состояний была показана на примере ряда белков, и объясняется наличием в промежуточных состояниях значительного количества гидрофобных групп, экспонированных на растворитель, которые могут формировать межмолекулярные взаимодействия [9, 10]. Важный вопрос заключается в том, какой тип агрегатов образует данное промежуточное состояние в конкретных условиях. Литературные данные свидетельствуют о том, что при pH 2,4 апоформа карбоксиангидразы формирует амилоидные агрегаты, тогда как при pH 3,6 не наблюдается образования амилоидов и, при повышении температуры белок образует аморфные агрегаты [26]. Исходя из результатов данной работы, можно предположить, что высокая населенность при pH 3,6 состояния I<sub>1</sub>, которое формирует α-спиральные ассоциаты, препятствует амилоидной агрегации карбоксиангидразы в данных условиях.

В процессе сворачивания белка происходит постепенное структурирование белковых молекул, поэтому, кажется очевидным, что в промежуточных состояниях формируются преимущественно нативные взаимодействия. Однако для ряда β-структурных белков показано, что при их сворачивании происходит

**Таблица 4.** Содержание элементов вторичной структуры конформационных состояний карбоксиангидразы, рассчитанное с помощью алгоритма K<sub>2</sub>D

Состояние	α-спирали, %	β-структура, %	Клубок, %
N	12,1	30,4	57,5
I <sub>1</sub>	68,6	1,1	22,4
I <sub>2</sub>	26,0	16,4	57,6

образование промежуточных состояний с высоким содержанием ненативных  $\alpha$ -спиралей, которые на последующих этапах сворачивания подвергаются конформационным перестройкам с формированием  $\beta$ -структуры [19, 20]. Значительное количество работ посвящено исследованию роли  $\alpha$ -спиральных интермедиатов в процессе сворачивания  $\beta$ -структурных белков и возможных причин их формирования. Согласно гипотезе Лима любая аминокислотная последовательность, формирующая  $\beta$ -структуру, может в определенных условиях образовывать стабильную  $\alpha$ -спираль [46, 47]. С помощью сервера CFSSP, исходя из аминокислотной последовательности карбоксиангидразы, были определены участки белка, способные формировать  $\alpha$ -спирали [48]. Согласно полученным результатам, 63% последовательности карбоксиангидразы формирует стабильную  $\alpha$ -спиральную структуру, что приблизительно совпадает с процентным содержанием спиралей в состоянии I<sub>1</sub>, рассчитанным по результатам КД (табл. 4). Вероятно,  $\beta$ -структура в нативном состоянии карбоксиангидразы стабилизирована третичными взаимодействиями, разрушение которых при денатурации приводит к формированию  $\alpha$ -спиралей, стабильность которых определяется первичной структурой белка.

*Работа по экспрессии и очистке карбоксиангидразы поддержана грантом РФФИ № 18-34-00935, исследование стабильности белка поддержано грантом РНФ № 14-24-00157.*

#### **Список литературы / References:**

1. Kolb V.A., Makeyev E.V., Spirin A.S. Folding of firefly luciferase during translation in a cell-free system. *EMBO J.*, 1994, vol. 13, pp. 3631-3637.
2. Dill K.A., MacCallum J.L. The protein-folding problem, 50 years on. *Science*, 2012, vol. 338, pp. 1042-1046.
3. Anfinsen C.B. The formation and stabilization of protein structure. *Biochem. J.*, 1972, vol. 128, pp. 737-749.
4. Honig B. Protein folding: from the Levintal paradox to structure prediction. *J. Mol. Biol.*, 1999, vol. 293, pp. 283-293.
5. Privalov P.L., Khechinashvili N.N. A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study. *J. Mol. Biol.*, 1974, vol. 86, pp. 665-684.
6. Privalov P.L. Intermediate states in protein folding. *J. Mol. Biol.*, 1996, vol. 258, pp. 707-725.
7. Brockwell D.J., Radford S.E. Intermediates: ubiquitous species on folding energy landscapes? *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2007, vol. 17, pp. 30-37.
8. Baldwin R.L., Rose G.D. Is protein folding hierarchic? I. Local structure and peptide folding. *Trends Biochem. Sci.*, 1999, vol. 24, pp. 26-33.
9. Calamai M., Chiti F., Dobson C.M. Amyloid fibril formation can proceed from different conformations of a partially unfolded protein. *Biophys. J.*, 2005, vol. 89, pp. 4201-4210.
10. Apetri A.C., Surewicz K., Surewicz W.K. The effect of disease-associated mutations on the folding pathway of human prion protein. *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279, pp. 18008-18014.
11. Dolgikh D.A., Gilmanshin R.I., Brazhnikov E.V., Bychkova V.E., Semisotnov G.V., Venyaminov S., Ptitsyn O.B. Alpha-lactalbumin: Compact state with fluctuating tertiary structure? *FEBS Letters*, 1981, vol. 136, pp. 311-315.
12. Ptitsyn O.B., Pain R.H., Semisotnov G.V., Zerovnik E., Razgulyaev O.I. Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding. *FEBS Letters*, 1990, vol. 262, pp. 20-24.
13. Naiyer A., Hassan M.I., Islam A., Sundd M., Ahmad F. Structural characterization of MG and pre-MG states of proteins by MD simulations, NMR, and other techniques. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2015, vol. 33, pp. 2267-2284.
14. Hughson F.M., Wright P.E., Baldwin R.L. Structural characterization of a partly folded apomyoglobin intermediate. *Science*, 1990, vol. 249, pp. 1544-1548.
15. Uversky V.N., Ptitsyn O.B. Further evidence on the equilibrium 'pre-molten globule state': Four-state guanidinium chloride-induced unfolding of carbonic anhydrase b at low temperature. *J. Mol. Biol.*, 1996, vol. 255, pp. 215-228.
16. Uversky V.N., Ptitsyn O.B. 'Partly folded' state, a new equilibrium state of protein molecules: Four-state guanidinium chloride-induced unfolding of beta-lactamase at low temperature. *Biochemistry*, 1994, vol. 33, pp. 2782-2791.
17. Uversky V.N., Goto Y. Acid denaturation and anion-induced folding of globular proteins: multitude of equilibrium partially folded intermediates. *Curr. Protein Pept. Let.*, 2009, vol. 10, pp. 447-455.
18. Neuweiler H., Doose S., Sauer M. A microscopic view of miniprotein folding: enhanced folding efficiency through formation of an intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, vol. 102, pp. 16650-16655.
19. Forge V., Hoshino M., Kuwata K., Arai M., Kuwajima K., Batt C.A., Goto Y. Is folding of beta-lactoglobulin non-hierarchic? Intermediate with native-like beta-sheet and non-native alpha-helix. *J. Mol. Biol.*, 2000, vol. 296, pp. 1039-1051.
20. Yang J.J., Yang H., Ye Y., Hopkins H.Jr., Hastings G. Temperature-induced formation of non-native intermediate state of the all beta-sheet protein CD2. *Cell Biochem. Biophys.*, 2002, vol. 36, pp. 1-18.
21. Sakurai K., Fujioka S., Konuma T., Yagi M., Goto Y. A circumventing role for the non-native intermediate in the folding of  $\beta$ -lactoglobulin. *Biochemistry*, 2011, vol. 50, pp. 6498-6507.
22. Friel C.T., Beddard G.S., Radford S.E. Switching two-state to three-state kinetics in the helical protein Im9 via the optimisation of stabilising non-native interactions by design. *J. Mol. Biol.*, 2004, vol. 342, pp. 261-273.

23. Uzawa T., Nishimura C., Akiyama S., Ishimori K., Takahashi S., Dyson H.J., Wright P.E. Hierarchical folding mechanism of apomyoglobin revealed by ultra-fast H/D exchange coupled with 2D NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, vol. 105, pp. 13859-13864.
24. Maisuradze G.G., Zhou R., Liwo A., Xiao Y., Scheraga H.A. Effects of mutation, truncation, and temperature on the folding kinetics of WW domain. *J. Mol. Biol.*, 2012, vol. 420, pp. 350-365.
25. Es-Haghi A., Shariatizi S., Ebrahim-Habibi A., Nemat-Gorgani M. Amyloid fibrillation in native and chemically-modified forms of carbonic anhydrase II: role of surface hydrophobicity. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, vol. 1824, pp. 468-477.
26. Gard D.K., Kundu B. Clues for divergent, polymorphic amyloidogenesis through dissection of amyloid forming steps of bovine carbonic anhydrase and its critical amyloid forming stretch. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2016, vol. 1864, pp. 794-804.
27. Krishnamurthy V.M., Kaufman G.K., Urbach A.R., Gitlin I., Gudixsen K.L., Weibel D.B., Whitesides G.M. Carbonic anhydrase as a model for biophysical and physical-organic studies of proteins and protein-ligand binding. *Chem. Rev.*, 2008, vol. 108, pp. 946-1051.
28. Saito R., Sato T., Ikai A., Tanaka N. Structure of bovine carbonic anhydrase II at 1.95 Å resolution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 2004, vol. 60, pp. 792-795.
29. Uversky V.N., Ptitsyn O.B. Further evidence on the equilibrium “pre-molten globule state”: four-state guanidinium chloride-induced unfolding of carbonic anhydrase B at low temperature. *J. Mol. Biol.*, 1996, vol. 255, pp. 215-228.
30. Bushmarina N.A., Kuznetsova I.M., Biktashev A.G., Turoverov K.K., Uversky V.N. Partially folded conformations in the folding pathway of bovine carbonic anhydrase II: a fluorescence spectroscopic analysis. *ChemBiochem.*, 2001, vol. 2, pp. 813-821.
31. Ptitsyn O.B., Pain R.H., Semisotnov G.V., Zerovnik E., Razgulyaev O.I. Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding. *FEBS Lett.*, 1990, vol. 262, pp. 20-24.
32. Dolgikh D.A., Kolomiets A.P., Bolotina I.A., Ptitsyn O.B. ‘Molten-globule’ state accumulates in carbonic anhydrase folding. *FEBS Lett.*, 1984, vol. 165, pp. 88-92.
33. Melnik B.S., Marchenkov V.V., Evdokimov S.R., Samatova E.N., Kotova N.V. Multy-state protein: determination of carbonic anhydrase free-energy landscape. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, vol. 369, pp. 701-706.
34. McCoy L.F. Jr, Rowe E.S., Wong K.P. Multiparameter kinetic study on the unfolding and refolding of bovine carbonic anhydrase B. *Biochemistry*, 1980, vol. 19, pp. 4736-4743.
35. Andersson D., Hammarstrom P., Carlsson U. Cofactor-induced refolding: refolding of molten globule carbonic anhydrase induced by Zn(II) and Co(II). *Biochemistry*, 2001, vol. 40, pp. 2653-2661.
36. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680-685.
37. Gill S.C., von Hippel P.H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, 1989, vol. 182, pp. 319-326.
38. Kawahara K., Tanford C. Viscosity and density of aqueous solutions of urea and guanidine hydrochloride. *J. Biol. Chem.*, 1966, vol. 241, pp. 3228-3232.
39. Oliveberg M., Fersht A.R. Formation of electrostatic interactions on the protein-folding pathway. *Biochemistry*, 1996, vol. 35, pp. 2726-2737.
40. Jamin M., Geierstanger B., Baldwin R.L. The pKa of His-24 in the folding transition state of apomyoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, vol. 98, pp. 6127-6131.
41. Bolen D.W., Santoro M.M. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 2. Incorporation of delta G degrees N-U values in a thermodynamic cycle. *Biochemistry*, 1998, vol. 27, pp. 8069-8074.
42. Pace C.N. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.*, 1986, vol. 131, pp. 266-280.
43. Kelly S.M., Price N.C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2000, vol. 1, pp. 349-384.
44. Semisotnov G.V., Rodionova N.A., Razgulyaev O.I., Uversky V.N., Gripas' A.F., Gilmanshin R.I. Study of the “molten globule” intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers*, 1991, vol. 31, pp. 119-128.
45. Andrade M.A., Chacon P., Merelo J.J., Moran F. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng.*, 1993, vol. 6, pp. 383-390.
46. Chen E., Everett M.L., Holzkecht Z.E., Holzkecht R.A., Lin S.S., Bowles D.E., Parker W. Short-lived alpha-helical intermediates in the folding of beta-sheet proteins. *Biochemistry*, 2010, vol. 49, pp. 5609-5619.
47. Lim V.I. Structural principles of the globular organization of protein chains. A stereochemical theory of globular protein secondary structure. *J. Mol. Biol.*, 1974, vol. 88, pp. 857-872.
48. Kumar T.A. CFSSP: Chou and Fasman secondary structure prediction server. *Wide Spectrum*, 2013, vol. 1, pp. 15-19.

## STRUCTURAL FEATURES AND STABILITY OF CARBONIC ANHYDRASE INTERMEDIATE STATES

Katina N.S.<sup>1</sup>, Balobanov V.A.<sup>1</sup>, Plyina N.B.<sup>1</sup>, Markelova N.Y.<sup>2</sup>, Kashparov I.A.<sup>1</sup>, Marchenkov V.V.<sup>1</sup><sup>1</sup>Institute of Protein Research RAS*Institutskaya St., 4, Pushchino, 142290, Russia*<sup>2</sup>Institute of Cell Biophysics*Institutskaya St., 3, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: delfinium27@rambler.ru*

**Abstract.** Carbonic anhydrase is a globular single-domain protein; its native state is dominated by  $\beta$ -structure. In this work the study of pH-induced equilibrium unfolding of carbonic anhydrase apoform has been carried out. It was shown that the protein denaturation by low pH represents the three-state transition  $N \rightarrow I_1 \rightarrow I_2$ . Addition of urea to  $I_2$  leads to its unfolding to the unfolded state  $I_2 \rightarrow U$ . Using approximation of pH-induced and urea-induced equilibrium unfolding transition curves the estimation of the stability of carbonic anhydrase native and both intermediate states was carried out. Described approach can be used further for investigation of the influence of amino acid substitutions on the folding process of this protein. Moreover in this work the structural features of carbonic anhydrase conformational states were investigated, obtained results concluded that  $I_1$  forms associates and contains nonnative  $\alpha$ -helical regions.

**Key words:** carbonic anhydrase, protein folding, intermediate state, equilibrium unfolding, circular dichroism.