

## БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПО ДАННЫМ ТРАНСЛЯЦИОННОЙ ДИФФУЗИИ

Кусова А.М., Ситницкий А.Э., Зуев Ю.Ф.

Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН  
ул. Лобачевского, 2/31, г. Казань, 420001, РФ; e-mail: alexakusova@mail.ru

Поступила в редакцию: 02.07.2020

**Аннотация.** В статье представлена информация о трансляционной диффузии неструктурированного  $\alpha$ <sub>S</sub>-казеина и жесткого глобулярного  $\alpha$ -химотрипсина в качестве инструмента для оценки межмолекулярных взаимодействий в водных белковых растворах. Коэффициенты самодиффузии и взаимной диффузии белков были получены методами Ядерного Магнитного Резонанса с Импульсным Градиентом Магнитного Поля (ЯМР ИГМП) и Динамического Рассеяния Света (ДРС). Теоретическое описание экспериментальных данных основывалось на фрикционном формализме неравновесной термодинамики. В результате были получены наборы вириальных коэффициентов, содержащие информацию о различных типах и вкладах межмолекулярных взаимодействий. Вторые вириальные коэффициенты были рассчитаны с помощью модели белок-белкового потенциала средней силы, которая включает в себя описание электростатических и дисперсионных взаимодействий. Предложенный комплексный подход позволил оценить вклады различных взаимодействий и описать межмолекулярные взаимодействия белков, принципиально отличающихся по форме и структуре.

**Ключевые слова:** белок-белковые взаимодействия, второй вириальный коэффициент, трансляционная диффузия, ЯМР, ДРС

### ВВЕДЕНИЕ

Измерение и оценка межмолекулярных взаимодействий в разбавленных и концентрированных белковых растворах важны для понимания биологических процессов *in vitro* и в клеточной среде, а также для разработки и оптимизации биотехнологических процессов. Роль межмолекулярных взаимодействий резко возрастает в концентрированных белковых растворах, где они влияют на вязкость, разделение фаз, растворимость и агрегацию, изменяя функциональные свойства белка и тем самым вызывая сложности при создании белковых продуктов.

До недавнего времени большинство различных экспериментальных физико-химических исследований белков были сосредоточены на изучении разбавленных растворов. Это обусловлено, главным образом, возможностями используемых экспериментальных методов и ограничениями базовых теорий, разработанных для разбавленных систем. Однако в последнее время все чаще встречаются исследования, проведенные в концентрированных системах [1]. Макромолекулярный краудинг оказывает сильное влияние на большинство биологических процессов, включая транспортные и функциональные свойства макромолекул [2,3]. В связи с этим, изучение межмолекулярных взаимодействий с помощью известных теоретических подходов и их модификаций применительно к концентрированным растворам является важной задачей.

Основным физическим свойством, которое непосредственно влияет на растворимость, агрегацию [4-6] и кристаллизацию [7] белков является суммарный заряд белка. В разбавленных растворах основной вклад в белковые взаимодействия вносит электростатика, которая может быть описана вторым вириальным коэффициентом  $A_2$ , учитывающим парные взаимодействия. Значение  $A_2$  содержит информацию о потенциале Гамакера, электростатическом отталкивании, заряд-дипольных и диполь-дипольных взаимодействиях и характеризует слабые, неспецифичные парные взаимодействия в белковых растворах. Существуют модели, рассматривающие молекулы белка без учета их поверхности, структуры и поверхностного распределения заряда, которые могут предсказать значение второго вириального коэффициента [8]. Такие модели, основанные идеализированной молекулярной геометрии, дают возможность оценить влияние межмолекулярных взаимодействий на молекулярное движение в разбавленных и полурастворенных растворах. В случае концентрированных растворов второй вириальный коэффициент не может предоставить достаточную информацию о белковых взаимодействиях, поскольку необходимо учитывать влияние многочастичных взаимодействий [9].

Известны попытки охарактеризовать межмолекулярные взаимодействия в белковых системах посредством трансляционной диффузии с точки зрения исключенного объема и ограниченного движения. [10] Однако на практике поведение белка в растворе не может быть описано без учета межмолекулярных взаимодействий. В настоящей работе для теоретического описания экспериментальных результатов мы применили фрикционный формализм неравновесной термодинамики, предложенный Винком. [11] Этот подход обеспечивает связь между экспериментально наблюдаемыми коэффициентами трансляционной диффузии (полученным с помощью ЯМР и ДРС) и фрикционными и вириальными коэффициентами. Далее мы использовали общую теорию решений Макмиллана-Майера, которая связывает  $A_2$  с потенциалом средней силы  $W$ . В наших предыдущих исследованиях [12,13] мы применяли теорию Винка для анализа экспериментальных данных о длительной поступательной

диффузии различных белков, полученных с помощью ядерного магнитного резонанса с импульсным градиентом магнитного поля (ЯМР ИГМП). В настоящей работе мы предприняли попытку расширить подход Винка к анализу «short-time» диффузии, наблюдаемой с помощью динамического рассеяния света (ДРС). Мы сравнили диффузионное поведение, наблюдаемое с помощью ДРС и ЯМР, чтобы получить информацию о слабых межмолекулярных взаимодействиях на примере двух белков с одинаковыми молекулярными массами и разными типами внутренних структур: жесткий глобулярный  $\alpha$ -химоотрипсин (ChTr) и внутренне неструктурированный  $\alpha$ <sub>S</sub>-казеин ( $\alpha$ <sub>S</sub>-CN). Предложенный многоступенчатый подход позволил определить вириальные коэффициенты высшего порядка, характеризующие разные уровни взаимодействия белков в растворе [14]. Также было проведено сравнение значений экспериментальных и рассчитанных вторых вириальных коэффициентов и получена информация о парных межбелковых взаимодействиях ChTr и  $\alpha$ <sub>S</sub>-CN.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лиофилизированный  $\alpha$ <sub>S</sub>-CN с молекулярной массой 23,6 кДа из коровьего молока (SIGMA-ALDRICH, США) исследовали в водных растворах при температуре 30 °С. Исходные растворы готовили при 0,01 М NaCl. Значение pH доводили до 7,0 путем добавления NaOH. Лиофилизированный бычий ChTr с молекулярной массой 24,8 кДа, тип II, (SIGMA-ALDRICH, США) исследовали в водном растворе при T = 25 °С, pH = 3 (путем добавления HCl), I = 0,01 М.

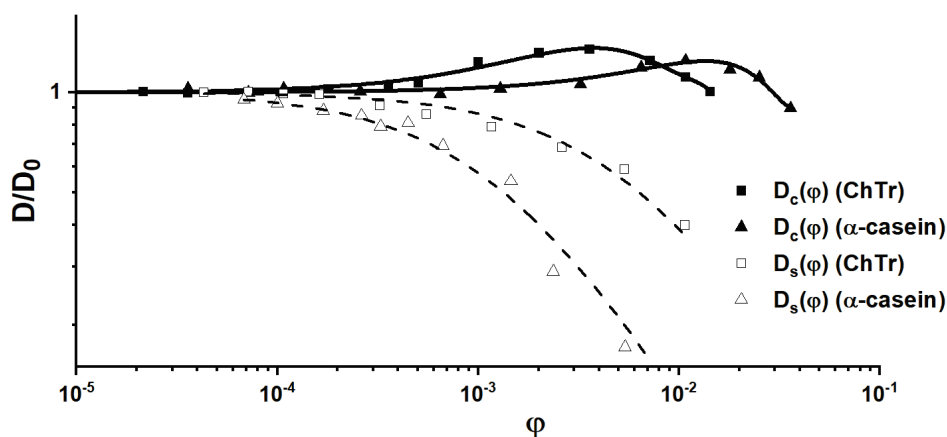
Диффузионное поведение  $\alpha$ <sub>S</sub>-CN и ChTr анализировали с помощью метода динамического рассеяния света с использованием Photocor Complex (Photocor), оснащенного He-Ne-лазером ( $\lambda = 632,8$  нм). Температуру камерного отсека контролировали в пределах 0,1 °С с помощью термоэлектрического модуля. Коэффициент диффузии регистрировали в кювете из тератного стекла с радиусом 1 см, коэффициенты диффузии определяли с точностью 10%. Растворы белков фильтровали через мембрану 0,2 мкм непосредственно в кювету, контролируя концентрацию белка после фильтрации.

<sup>1</sup>H ЯМР эксперименты проводили на ЯМР-спектрометре Bruker AVANCE III (600,13 МГц), оснащенным инверсным трехканальным датчиком (ТХ1, 5 мм) с максимальным градиентом поля 0,55 Т см<sup>-1</sup>. Обработка данных и анализ проводились с использованием программного обеспечения Bruker Topspin 3.6.1. Принимая во внимание возможные экспериментальные ошибки в определении концентрации и pH, коэффициенты самодиффузии определялись с точностью 7-9%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Концентрационные зависимости коэффициентов диффузии  $\alpha$ <sub>S</sub>-CN и ChTr были получены двумя независимыми экспериментальными методами ДРС и ЯМР ИГМП (рис. 1). Следует отметить, что в этих двух экспериментальных подходах наблюдаются разные диффузионные эффекты, обозначаемые  $D_s$  в случае самодиффузии (ЯМР ИГМП) и  $D_c$  в случае коллективной диффузии (ДРС). Разница в концентрационных зависимостях  $D_c$  и  $D_s$  (рис. 1) отражает разное время наблюдения в этих экспериментальных подходах [15].

Концентрационные зависимости коэффициентов коллективной диффузии  $D_c(\varphi)$  для ChTr и  $\alpha$ <sub>S</sub>-CN были получены методом ДРС. Начальные почти горизонтальные участки кривых (рис. 1) характеризуют границы разбавленных растворов. Расположение максимума на концентрационных зависимостях  $D_c(\varphi)$  (рис. 1) и область слабой зависимости  $D_s(\varphi)$  (рис. 1) показывают, что диапазон разбавленных растворов шире для глобулярного ChTr по сравнению с неупорядоченным  $\alpha$ <sub>S</sub>-CN.



**Рисунок 1.** Нормированные концентрационные зависимости коэффициентов само- и коллективной диффузии  $D_c(\varphi)$   $D_s(\varphi)$  для  $\alpha$ <sub>S</sub>-CN (закрашенные и полые квадраты) и для ChTr (закрашенные и полые треугольники),  $D_0$  – коэффициент диффузии при бесконечном разбавлении.  $\varphi$  - объемная доля белка. Сплошные и пунктирные линии – аппроксимация экспериментальных данных теорией Винка

Таблица 1. Значения вириальных коэффициентов, полученные с использованием данных ДРС и подхода Винка

	$A_2 \cdot 10^{-4}, \text{ м}^3\text{М/кг}^2$	$A_3 \cdot 10^{-4}, \text{ м}^6\text{М/кг}^3$	$A_4 \cdot 10^{-4}, \text{ м}^9\text{М/кг}^4$	$A_5 \cdot 10^{-4}, \text{ м}^{12}\text{М/кг}^5$
$\alpha_S$ -CN	105	-28	3	0,12
ChTr	4,96	-0,08	0,00035	

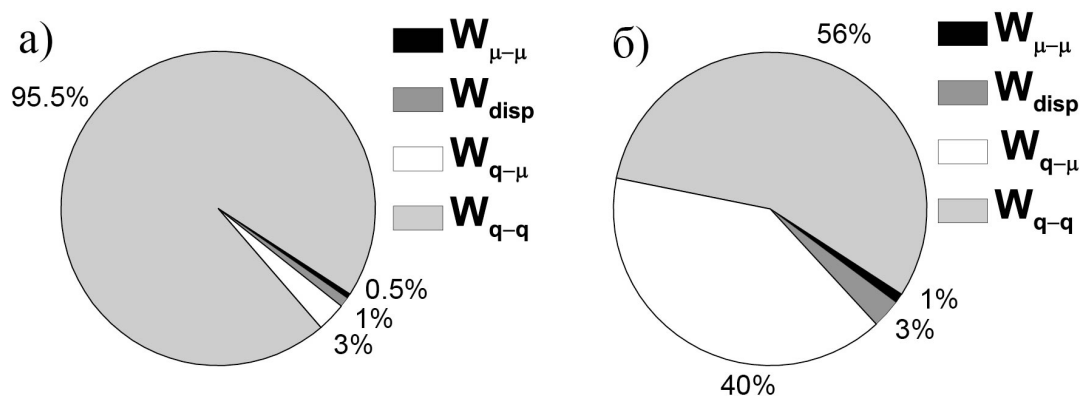


Рисунок 2 – Схематичное представление вкладов межмолекулярных взаимодействий ( $W_{q-q}$  – заряд-зарядовое,  $W_{q-\mu}$  – заряд-дипольное,  $W_{disp}$  - дисперсионное,  $W_{\mu-\mu}$  – диполь-дипольное межмолекулярные взаимодействия)  $\alpha_S$ -CN (а), ChTr (б)

Как обсуждалось выше, для теоретического описания  $D_c(\varphi)$ , мы использовали феноменологический подход, основанный на фрикционном формализме неравновесной термодинамики (теория Винка). Этот подход дает возможность проанализировать межмолекулярные взаимодействия белков, основываясь на значениях вириальных коэффициентов. Из рисунка 1 видно, что теория Винка хорошо совпадает с полученными экспериментальными данными коллективной диффузии в широком диапазоне концентраций как для  $\alpha_S$ -CN, так и для ChTr. Из аппроксимации были получены наборы вириальных коэффициентов для систем  $\alpha_S$ -CN и ChTr (таблица 1). Разница в числе вириальных коэффициентов для двух белков, вероятно, связана с наличием более дальнедействующих взаимодействий между молекулами  $\alpha_S$ -CN по сравнению с ChTr. Этот вывод следует из результатов аппроксимации, которая привела к резкому уменьшению всех значений вириальных коэффициентов ChTr и к полному отсутствию  $A_5$ . Второй вириальный коэффициент ( $A_2$ ) отображает взаимодействия в разбавленных растворах, а увеличение концентрации проявляется в ненулевых значениях вириальных коэффициентов более высокого порядка.

В настоящее время аналитическая связь между экспериментом и теорией существует только для  $A_2$ . Недостающие характеристики  $\alpha_S$ -CN и ChTr для расчетов  $A_2$  были получены из [14, 16-20]. Разница между экспериментальными и расчетными значениями  $A_2$  не превышает 15%, что является успешным результатом с учетом использования большого количества экспериментальных и теоретических данных.

На основании полученных результатов нами была сделана оценка вклада различных межмолекулярных взаимодействий, которые присутствуют в изученных белковых системах. Диаграммы на рисунке 2 показывают вклады различных типов взаимодействий. Видно, что заряд-зарядовый потенциал является преобладающим в обоих случаях. Но электрические заряды  $-21,3$  у  $\alpha_S$ -CN против  $+4,5$  у ChTr определяют более явное доминирование кулоновского отталкивания молекул  $\alpha_S$ -CN чем у ChTr. В случае ChTr заметными становятся вклады от других типов взаимодействия.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе представлен подход, позволяющий оценить межмолекулярные взаимодействия белковых молекул в растворе с помощью набора вириальных коэффициентов. Предложенный подход основан на анализе трансляционной само- и коллективной диффузии белка, полученной с помощью ЯМР ИГМП и ДРС соответственно. Экспериментальные результаты были проанализированы в рамках фрикционного формализма неравновесной термодинамики и ДЛФО теории взаимодействия коллоидных частиц в растворах электролитов. Второй и более высокий вириальные коэффициенты были получены для оценки парных и многочастичных межмолекулярных взаимодействий в растворах глобулярного  $\alpha$ -химотрипсина и неструктурированного  $\alpha_S$ -казеина. Было обнаружено, что основной вклад в межмолекулярные взаимодействия  $\alpha_S$ -казеина вносит кулоновское отталкивание между зарядами, тогда как для случая  $\alpha$ -химотрипсина существенную роль оказывают вклады других типов взаимодействия. Было установлено, что предложенный подход хорошо подходит для описания взаимодействий как глобулярных, так и внутренне неупорядоченных белков.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований, грант № 20-04-00157.

#### Список литературы / References:

1. Kuznetsova M., Zaslavsky B.Y., Breydo L., Turoverov K.K., Uversky V.N. Beyond the excluded volume effects: mechanistic complexity of the crowded milieu. *Molecules*, 2015, vol. 20, pp. 1377-1409.
2. Zimmerman S.B., Minton A.P. Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 1993, vol. 22, pp. 27-65.
3. Kuznetsova M., Turoverov K.K., Uversky V.N. What macromolecular crowding can do to a protein. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, vol. 15, pp. 23090-23140.
4. Shaw L.K., Grimsley G.R., Yakovlev G.I., Makarov A.A., Pace C.N. The effect of net charge on the solubility, activity, and stability of ribonuclease Sa. *Protein Science*, 2001, vol. 10, pp. 1206-1215.
5. Pelegrine D.H.G., Gasparetto C.A. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *Food Science and Technology*, 2005, vol. 38, pp. 77-80.
6. P. Schmittschmitt, J.M. Scholtz, *Protein Science*, 2003, vol. 12, pp. 2374-2378.
7. Neal B.L., Asthagiri D., Velev O.D., Lenhoff A.M., Kaler E.W. Why is the osmotic second virial coefficient related to protein crystallization? *Journal of Crystal Growth*, 1999, vol. 196, pp. 377-387.
8. Wu Z., Bratko D., Prausnitz J.M. Interaction between like-charged colloidal spheres in electrolyte solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998, vol. 95, pp. 15169-15172.
9. Dennison M., Masters A.J. High-level virial theory of hard spheroids. *Phys. Rev. E*, 2011, vol. 84, p. 021709 (1-11).
10. Roosen-Runge F., Hennig M., Zhang F., Jacobs R.M., Sztucki M., Schober H., Seydel T., Schreiber F. High-level virial theory of hard spheroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2011, vol. 108, pp. 11815-11820.
11. Vink H. Mutual diffusion and self-diffusion in the frictional formalism of non-equilibrium thermodynamics. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1*, 1985, vol. 81, pp. 1725-1730.
12. Tokuyama M., Oppenheim I. Dynamics of hard-sphere suspensions. *Phys. Rev. E*, 1994, vol. 50, pp. 16-19.
13. Kusova A.M., Sitnitsky A.E., Idiyatullin B.Z., Bakirova D.R., Zuev Yu.F. The effect of shape and concentration on translational diffusion of proteins measured by PFG NMR. *Appl Magn Reson.*, 2018, vol. 49, pp. 35-51.
14. Coen J., Blanch H.W., Prausnitz J.M. Salting out of aqueous proteins: phase equilibria and intermolecular potentials. *AIChE Journal*, 1995, vol. 41, pp. 996-1004.
15. Le Bon C., Nicolai T., Kuil M.E., Hollander J.G. Self-diffusion and cooperative diffusion of globular proteins in solution. *J. Phys. Chem.*, 1999, vol. 103, pp. 10294-10299.
16. Haynes C.A., Tamura K., Korfer H.R., Blanch H.W., Prausnitz J.M. Thermodynamic properties of aqueous alpha-chymotrypsin solution from membrane osmometry measurements. *J. Phys. Chem.*, 1992, vol. 96, pp. 905-912.
17. Israelachvili N. *Intermolecular and surface forces*. Third edition. Elsevier/Academic Press, University of California Santa Barbara, 2011.
18. Vilker V.L., Colton C.K., Smith K.A. The osmotic pressure of concentrated protein solutions: effect of concentration and pH in saline solutions of bovine serum albumin. *J. Colloid Interf. Sci.*, 1981, vol. 79, pp. 548-566.
19. Farrell Jr.H. M., Malin E.L., Brown E.M., Mora-Gutierrez A. Review of the chemistry of  $\alpha_{S2}$ -casein and the generation of a homologous molecular model to explain its properties *J. Dairy Sci.*, 2009, vol. 92, pp. 1338-1353.
20. Sotomayor-Pérez C., Karst J.C., Ladant D., Chenal A. Mean net charge of intrinsically disordered proteins: experimental determination of protein valence by electrophoretic mobility measurements *Intrinsically Disordered Protein Analysis*, 2012, vol. 2, pp. 331-349.

#### PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS ACCORDING TO TRANSLATIONAL DIFFUSION

Kusova A.M., Sitnitsky A.E., Zuev Yu.F.

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences  
Lobachevsky Str., 2/31 Kazan, 420111, Russian Federation, e-mail: alexakusova@mail.ru

**Abstract.** The article provides information on translational diffusion of unstructured  $\alpha_S$ -casein and hard globular  $\alpha$ -chymotrypsin as a tool for evaluating intermolecular interactions in aqueous protein solutions. The self- and mutual diffusion coefficients of proteins were obtained using Pulsed Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance (PFG NMR) and Dynamic Light Scattering (DLS) methods. The theoretical description of the experimental data was based on the friction formalism of nonequilibrium thermodynamics [1]. As a result, sets of virial coefficients containing information on various types and contributions of intermolecular interactions were obtained. Also, the second virial coefficients were calculated from the model of the protein – protein potential of mean force, that contains description of charge – charge, charge – dipole, dipole – dipole potentials, dispersion Hamaker and the mean force osmotic-attraction potentials [2]. The proposed complex approach to the study of protein interactions made it possible to estimate the contribution of various interactions and described the intermolecular interactions of proteins that are fundamentally different in shape and structure.

**Key words:** protein-protein interactions, second virial coefficient, translational diffusion, NMR PFG, DLS.