

## КИНЕТИКА РАЗВОРАЧИВАНИЯ ЛИЗОЦИМА В СМЕСЯХ ВОДЫ С ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ

Седов И.А., Магсумов Т.И.

Казанский федеральный университет  
ул. Кремлевская, 18, г. Казань, 420008, РФ  
e-mail: igor\_sedov@inbox.ru

**Аннотация.** Методом молекулярной динамики изучен процесс разворачивания лизоцима из белка куриного яйца в воде и ее смесях с диметилсульфоксидом (ДМСО) с содержанием ДМСО от 5 до 100 мольных процентов при повышенной температуре. Для каждого состава смеси записывались траектории длиной 30 нс, для воды – траектории длиной 130 нс. В воде за это время в значительной степени разрушается вторичная структура лизоцима и третичные контакты, однако белок остается в виде компактной глобулы. В смесях воды с ДМСО глобулярная структура за время симуляции теряется, причем и вторичная, и третичная структура разрушаются гораздо быстрее, чем в чистой воде. Средние времена разрушения третичной структуры, определенные с использованием разных критериев образования развернутой формы, хорошо согласуются между собой и убывают с увеличением концентрации ДМСО вплоть до 30 мольных процентов, а при дальнейшем ее повышении стабилизируются на постоянном уровне.

**Ключевые слова:** лизоцим, денатурация, молекулярная динамика, кинетика.

## KINETICS OF UNFOLDING OF LYSOZYME IN THE MIXTURES OF WATER WITH DIMETHYL SULFOXIDE

Sedov I.A., Magsumov T.I.

Kazan Federal University  
Kremlevskaya St., 18, Kazan, 420008, Russia  
e-mail: igor\_sedov@inbox.ru

**Abstract.** We conducted molecular dynamics simulations of the process of unfolding of hen egg white lysozyme at high temperature in water and its mixtures with dimethyl sulfoxide (DMSO) containing 5 to 100 mole percent of DMSO. For each composition of the mixture, we recorded 30 ns long trajectories, for pure water – 130 ns long trajectories. During this time, lysozyme in water substantially loses its secondary structure and tertiary contacts, but stays in a compact globular state. In mixtures of water with DMSO, the globule is being lost during the simulation, and both secondary and tertiary structure are disrupted much faster than in pure water. Average times of unfolding of the tertiary structure determined using different criteria of formation of the unfolded state are in good agreement with each other. They decrease with increasing concentrations of DMSO up to 30 mole percent, and with a further increase remain at a constant level.

**Key words:** lysozyme, denaturation, molecular dynamics, kinetics.

Механизм и скорость процесса денатурации белков могут существенно изменяться при изменении температуры, давления, pH, ионной силы раствора, добавлении различных химических веществ. Денатурация лизоцима из куриного яйца при различных условиях относительно хорошо изучена по сравнению с другими белками. Большое число работ посвящено исследованию термостабильности водных растворов лизоцима с различными концентрациями и при различных значениях pH, а также в присутствии различных денатурантов, включая распространенные органические растворители, смешивающиеся с водой: спирты, ацетонитрил, ацетон. Была исследована кинетика термической денатурации и ренатурации лизоцима в воде, обсуждена возможность образования интермедиатов, изменения вторичной и третичной структуры в ходе денатурации [1]. Отмечалось, что добавление органических растворителей может существенно изменять кинетику денатурации, в том числе и соотношение скоростей разрушения вторичной и третичной структур [2]. Однако в целом влияние денатурантов на механизм и скорость разворачивания белка остается малоизученным.

Диметилсульфоксид (ДМСО,  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ ) является малотоксичным растворителем, используемым для солюбилизации лекарственных средств и в качестве компонента проникающих криопротекторов для биологических образцов. Снижение термостабильности лизоцима под его действием изучалось методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) в растворе и различными спектроскопическими методами. Температура фазового перехода в растворе, соответствующая максимуму на ДСК-кривой, плавно понижается с увеличением концентрации ДМСО, достигая комнатной температуры при мольной доле ДМСО 0,4-0,5, в зависимости от наличия и pH буфера, в то время как в отсутствие ДМСО максимум наблюдается при 65-80 °С. Экспериментально установлено [3, 4], что при химической денатурации при комнатной температуре под действием ДМСО лизоцим теряет третичную структуру с сохранением некоторой части вторичной, которая разрушается при еще более высоких концентрациях органического компонента.

Метод молекулярной динамики может позволить получить информацию о молекулярном механизме разворачивания белка и влиянии на него различных денатурантов. Его важным недостатком является то, что для моделирования денатурации с явно заданным растворителем при тех температурах, когда она происходит в реальном эксперименте, требуются очень длинные траектории и большие вычислительные мощности. За временной промежуток до микросекунды разворачивание белков до состояния расплавленной глобулы или случайного клубка может наблюдаться лишь в симуляциях при 400-500 К. Большое отличие в температуре при моделировании может существенно сказаться на результатах, тем не менее, такой подход активно используется

и позволяет воспроизводить некоторые явления, наблюдаемые экспериментально. В то же время исследования денатурации белков в водно-органических средах с помощью молекулярной динамики немногочисленны, в том числе и потому, что для этого необходимо сначала разработать набор параметров взаимодействий для молекулы органического растворителя, воспроизводящий по меньшей мере экспериментальные свойства его смесей с водой. Ранее [5] было проведено моделирование лизоцима при 300 К в смесях с концентрацией от 0 до 40 мольных процентов ДМСО, однако непосредственно процесс разворачивания при такой температуре, естественно, не наблюдался.

В настоящей работе мы исследуем влияние состава смеси вода+ДМСО на скорость разворачивания лизоцима при повышенной температуре, получая количественные кинетические данные путем усреднения результатов нескольких симуляций. При этом мы сопоставляем скорости разрушения третичной и вторичной структуры белка в смесях различного состава и чистой воде.

Молекулярно-динамическое моделирование было проведено с помощью программы Gromacs 5.1. Было использовано силовое поле OPLS и модель воды SPC/E. Молекулы ДМСО моделировались с использованием объединенных атомов (OPLS-UA). Величины зарядов на атомах, геометрические параметры и параметры межмолекулярных взаимодействий были взяты из работы [6]. Для белка использовались параметры силового поля OPLS-AA. Все связи были фиксированы с помощью алгоритма LINCS. Радиус отсечения для ближних кулоновских и ван-дер-Ваальсовых взаимодействий составлял 1,0 нм. Для расчета дальних электростатических взаимодействий использовался метод PME. Постоянная температура поддерживалась с помощью термостата с масштабируемыми скоростями ( $v$ -rescale), в системах с постоянным давлением использовался баростат Парринелло-Рахмана. Использование вышеуказанных параметров позволяет с хорошей точностью воспроизводить свойства смесей вода+ДМСО различного состава: плотности, энтальпии смешения, коэффициенты самодиффузии. Смесь не разделяется на органическую и водную фазы при любой из рассматриваемых концентраций и температур.

Исходная структура лизоцима была взята из банка данных PDB (193L). Она была получена методом рентгеноструктурного анализа [7]. Белок был помещен в кубическую ячейку с периодическими граничными условиями вместе с 10000 молекулами воды и 8 анионами  $\text{Cl}^-$ , добавленными для того, чтобы суммарный заряд системы равнялся нулю. Система была минимизирована и уравновешена при 298.15 К и давлении 1 бар сначала в течение 100 пс с фиксацией тяжелых атомов белка, затем в течение 1 нс без фиксации. Полученная после уравновешивания в воде структура использовалась в дальнейших экспериментах.

Процесс разворачивания лизоцима изучался в схожих периодических ячейках, содержащих в общей сложности 10000 молекул растворителя (ДМСО и воды). Мольная доля ДМСО  $x_1$  варьировалась с шагом 0,05 единиц от 0 до 0,30, с шагом 0,10 от 0,30 до 0,60, и с шагом 0,20 от 0,60 до 1. Траектории записывались при 450 К в течение 30 нс для смесей и 130 нс для чистой воды. Эта температура выше, чем температура кипения SPC/E воды при давлении 1 бар (397 К). Несмотря на то, что смеси, содержащие ДМСО, могут и не кипеть при 450 К и 1 бар, их плотность значительно уменьшается по сравнению с реальной плотностью в экспериментах по денатурации при 320–350 К, которые мы пытаемся смоделировать. Альтернативой является поддержание той же плотности смеси, что и при низких температурах путем фиксации объема (NVT-ансамбль). Однако в этом случае давление становится настолько велико, что оно может влиять на процесс разворачивания [8]. Наш подход представляет собой компромисс между высоким давлением и низкой плотностью: после минимизации каждая ячейка нагревается до 400 К при постоянном давлении 1 бар в течение довольно короткого промежутка времени (200 пс) с фиксацией координат тяжелых атомов белка. После этого объем ячейки фиксируется и она нагревается до 450 К, а затем уравновешивается при этой температуре в течение 1 нс. Затем снимаются ограничения с координат атомов белка и записываются окончательные траектории. Запуски повторялись по 8 раз для каждого состава растворителя, каждый раз начиная с уравновешивания при 450 К.

Визуальный анализ траекторий с использованием программы VMD наглядно показывает различия процессов разворачивания белка в воде и смесях. Даже в присутствии 5% ДМСО за 30 нс структура белка успевает разрушиться по меньшей мере до состояния “расплавленной глобулы”. При высоких концентрациях ДМСО глобула за это время обычно полностью разрушается. При этом вторичная структура в значительной степени сохраняется до начала визуально наблюдаемого разрушения глобулы. В воде же все процессы идут гораздо медленнее, компактная структура белка во всех симуляциях сохранялась на протяжении 130 нс, а вот вторичная структура и третичные контакты разрушались.

Мы перевели результаты моделирования на количественный язык с помощью усреднения времен разворачивания белка по всем траекториям, что позволяет определить константу скорости процесса. Следует понимать, что переход между нативной и развернутой формами занимает значительное время, и невозможно сказать, в какой точно момент белок разворачивается, а можно лишь с использованием тех или иных приближений определить, когда изменения становятся достаточно заметны. Кроме того, третичная и вторичная структуры могут разрушаться с различными скоростями. При этом потеря компактности автоматически означает разрушение третичной структуры, но обратное утверждение неверно. Как мы уже увидели в случае воды, белок может оставаться в компактном состоянии даже при потере третичных контактов.

Для подсчета числа элементов вторичной структуры лизоцима мы использовали алгоритм DSSP. Для изучения изменений третичной структуры можно использовать множество различных подходов. Мы выбрали и сравнили некоторые из них, а именно зависимости от времени общего среднеквадратичного отклонения атомных положений  $\alpha$ -атомов аминокислот ( $\text{C}\alpha$ -RMSD), радиуса инерции ( $R_g$ ), неполярной доступной площади

поверхности (SASA). Кроме того, нами было замечено, что на ранних стадиях процесса разворачивания в бинарных смесях разрушается контакт между двумя спирализованными участками в молекуле лизоцима (см. рис. 1). Это приводит к значительному увеличению радиуса инерции и доступной для растворителя поверхности, молекула перестает быть компактной. Вскоре следует разрушение ряда других контактов, после чего белок уже не возвращается к структуре, напоминающей исходное состояние. Таким образом, мы можем рассматривать потерю контакта между фрагментами 6-15 и 89-100 аминокислотной последовательности как критическое событие для разрушения третичной структуры в целом. Сумма  $D$  расстояний между  $C\alpha$ -атомами остатков His15–Thr89 и Arg21–Ser100 была выбрана нами в качестве еще одного параметра, с помощью которого можно судить о распаде третичной структуры.

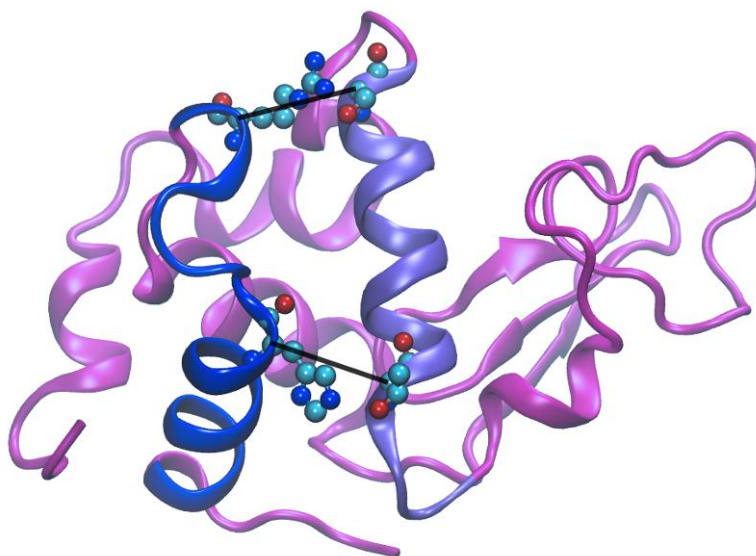


Рисунок 1 – Контакты между остатками в нативной структуре лизоцима, отслеживаемые при изучении разрушения третичной структуры

Для определения времени (начала) разрушения третичной структуры  $t_U$  использовались критические значения каждого из вышеуказанных параметров: 0,7 нм для  $C\alpha$ -RMSD, 1,6 нм для Rg, 36 нм<sup>2</sup> для SASA, 3,1 нм для  $D$ . Они приблизительно соответствуют половине средней величины скачка соответствующих параметров при переходе из нативной к развернутой форме, а в случае  $D$  – увеличенным в 2 раза по сравнению с нативной формой расстояниям. Все параметры рассчитывались каждые 2 пс, а во избежание резких случайных скачков проводилось усреднение результатов по 100 соседним точкам траектории. Таким образом, “разрешение” полученных зависимостей составляет 200 пс. На рисунке 2 приведены зависимости усредненных по 8 траекториям величин  $t_U$ , определенных каждым из этих способов, а также с помощью субъективного визуального анализа для лизоцима в смесях ДМСО с водой.

Результаты различных методов в целом согласуются друг с другом и с визуальным анализом. Наблюдается уменьшение времени разворачивания с увеличением мольной доли ДМСО до 0,30 и отсутствие существенных изменений этого времени в смесях с большим содержанием ДМСО. В водном растворе без ДМСО при применении критериев, связанных с SASA и Rg, критические значения за время симуляции не достигаются, поскольку глобула в целом не разрушается. Критическое значение RMSD в определенный момент превышает, однако эта величина чувствительна к изменениям структуры отдельных участков молекулы белка, в том числе вторичной структуры. Поэтому более разумно судить о потере третичной структуры в воде по потере нативного третичного контакта на основе значений  $D$ , что дает величину  $\langle t_U \rangle$  в воде около 44 нс, хотя такая оценка тоже может быть очень неточной, так как не учитываются другие контакты.

Для изучения изменений вторичной структуры методом DSSP на протяжении всех траекторий были вычислены суммарные содержания альфа- и  $3_{10}$ -спиралей. Усреднение данных, аналогично изучению третичной структуры, проводилось каждые 200 пс. Для каждого состава смеси было определено среднее время “полураспада”, за которое общее содержание спиралей падает вдвое (см. рис. 3). Кроме того, для каждой траектории было вычислено остаточное содержание спиральных структур в тот момент, когда начинается разрушение третичной структуры (согласно критерию SASA). Это содержание было также усреднено по всем траекториям для данного состава. Его зависимость от мольной доли ДМСО приведена на рисунке 4.

Результаты дают возможность сделать вывод, что в воде вторичная структура, как и третичные контакты лизоцима разрушаются гораздо медленнее, чем в смесях воды с ДМСО. При низких концентрациях ДМСО доля спиральных структур к началу разворачивания белка оказывается несколько ниже, чем при высоких.

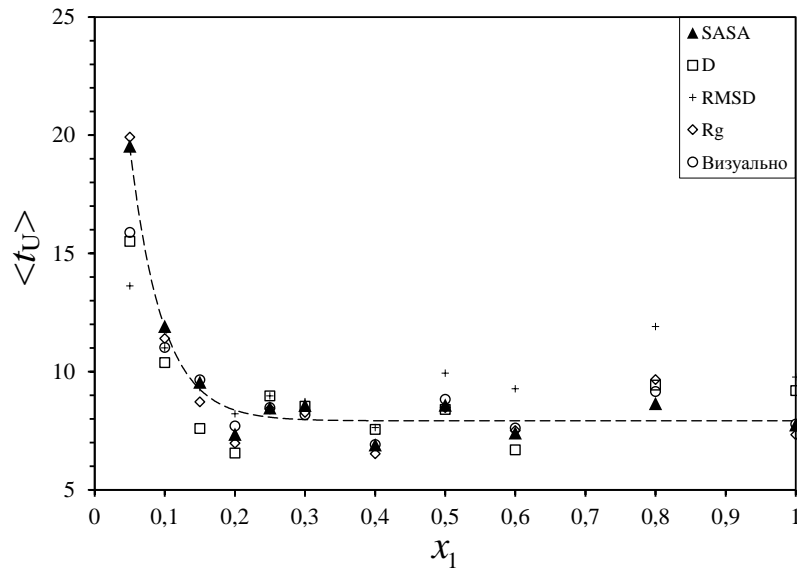


Рисунок 2 – Среднее время  $\langle t_U \rangle$  до разрушения третичной структуры лизоцима при 450 К в смесях ДМСО с водой, определенное с использованием различных методов

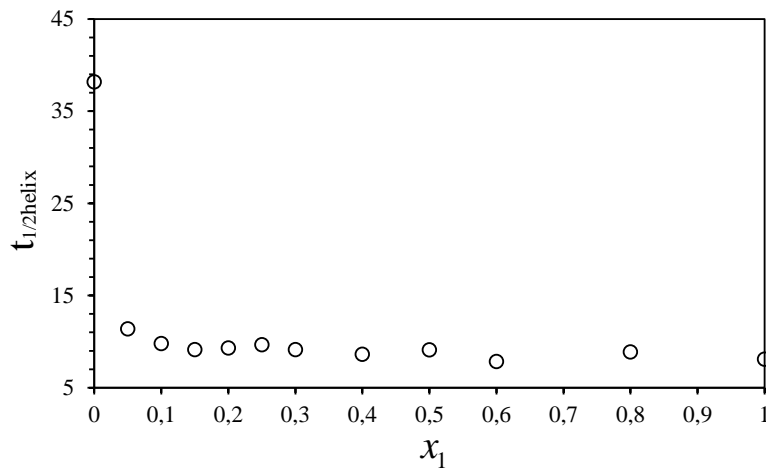


Рисунок 3 – Среднее время, за которое число остатков, участвующих в образовании спиральных структур, уменьшается вдвое

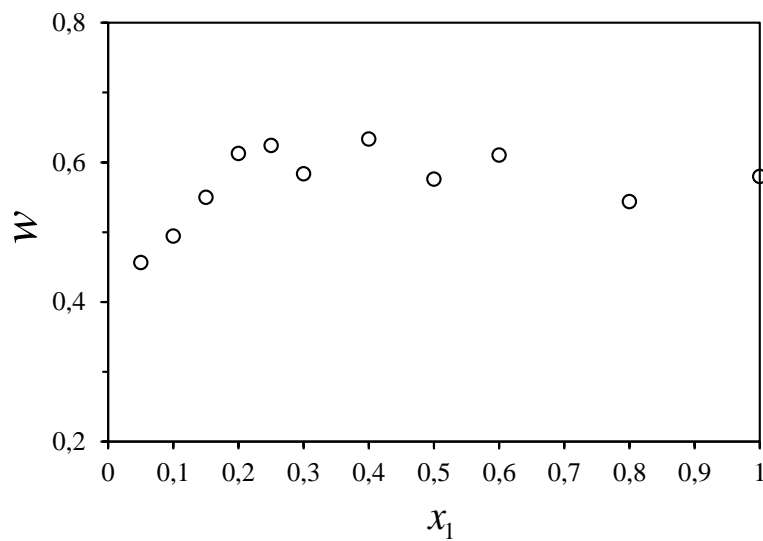


Рисунок 4 – Средняя доля остатков, сохранивших спиральную структуру до момента разрушения третичной структуры

Поскольку при сворачивании белка вторичная структура формируется раньше третичной, следует полагать, что разрушение вторичной структуры приводит к дестабилизации третичных контактов и компактного глобулярного состояния. Однако процесс разворачивания сопровождается увеличением площади доступной растворителю неполярной поверхности, что невыгодно в случае растворов в чистой воде и может послужить причиной некоторой кинетической стабилизации компактного состояния. Молекулы ДМСО могут значительно ускорить этот процесс, сольватируя неполярные участки.

Яркое отличие компактных дезорганизованных структур, являющихся, по всей видимости, кинетически устойчивыми интермедиатами, в которые превращается белок в симуляциях с водой, от развернутых, близких к случайным клубкам конформаций, которые быстро образуются в бинарных смесях, требует экспериментальной проверки на основе детального исследования комплексом физических методов.

#### *Список литературы / References:*

1. Laurents D.V., Baldwin R.L. Characterization of the unfolding pathway of hen egg white lysozyme. *Biochemistry (Mosc.)*, 1997, vol. 36, no. 6, pp. 1496-1504.
2. Esposito A. [et al.] Influence of Glycerol on the Structure and Thermal Stability of Lysozyme: A Dynamic Light Scattering and Circular Dichroism Study. *J. Phys. Chem. B.*, 2009, vol. 113, no. 51, pp. 16420-16424.
3. Voets I.K. [et al.] DMSO-Induced Denaturation of Hen Egg White Lysozyme. *J. Phys. Chem. B.*, 2010, vol. 114, no. 36, pp. 11875-11883.
4. Bhattacharjya S., Balaram P. Effects of organic solvents on protein structures: observation of a structured helical core in hen egg-white lysozyme in aqueous dimethylsulfoxide. *Proteins.*, 1997, vol. 29, no. 4, pp. 492-507.
5. Roy S., Jana B., Bagchi B. Dimethyl sulfoxide induced structural transformations and non-monotonic concentration dependence of conformational fluctuation around active site of lysozyme. *J. Chem. Phys.*, 2012, vol. 136, no. 11, p. 115103.
6. Zheng Y.-J., Ornstein R.L. A Molecular Dynamics and Quantum Mechanics Analysis of the Effect of DMSO on Enzyme Structure and Dynamics: Subtilisin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, vol. 118, no. 17, pp. 4175-4180.
7. Vaney M.C. et al. High-Resolution Structure (1.33 Å) of a HEW Lysozyme Tetragonal Crystal Grown in the APCF Apparatus. Data and Structural Comparison with a Crystal Grown under Microgravity from SpaceHab-01 Mission. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 1996, vol. 52, no. 3, pp. 505-517.
8. Walser R., Mark A.E., van Gunsteren W.F. On the Temperature and Pressure Dependence of a Range of Properties of a Type of Water Model Commonly Used in High-Temperature Protein Unfolding Simulations. *Biophys. J.*, 2000, vol. 78, no. 6, pp. 2752-2760.

#### INTERRELATION OF ENTROPIC CONTRIBUTORS TO $\pi$ -STACKING IN SOLUTION

Starodub M.A.<sup>1</sup>, Lantushenko A.O.<sup>1</sup>, Evstigneev V.P.<sup>1</sup>, Golovchenko I.V.<sup>1</sup>, Mosunov A.A.<sup>1</sup>, Evstigneev M.P.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Sevastopol State University  
Sevastopol, 299053, Russia

<sup>2</sup> Belgorod State University  
Pobedy Str., 85, Belgorod, 308015, Russia  
e-mail: max\_evstigneev@mail.ru

**Abstract.** The recently published most complete set of thermodynamical data on self- and hetero-complexation of aromatic molecules measured under comparable conditions of experiment was analysed with an aim of getting insight into contribution of various entropic factors to  $\pi$ -stacking in aqueous solution. It was found that the experimental entropy change on  $\pi$ -stacking is determined by counterbalancing effect of two principal factors, *viz.* the hydrophobic interaction (positive contribution) and the loss of degrees of freedom (negative contribution), modulated by electrostatic contribution. The mixing entropy contribution originating from the overall ordering of system due to  $\pi$ -stacking complexation is zero.

**Key words:** self-assembly; hetero-complexation; mixing entropy; entropic contribution

#### **Introduction.**

Understanding the role of various physical factors in  $\pi$ -stacking of aromatic moieties in solution is of fundamental interest in physical chemistry, and is required for getting insight into a range of processes of chemical and biological interest [1-3]. Much theoretical and experimental work has been done towards understanding the nature of forces driving the complex formation stabilized by stacking interactions, although the interrelation of enthalpic and entropic factors in the net Gibbs free energy of the  $\pi$ -stacking is still under discussion. The most vivid examples are the long-lasting problems of decomposition of  $\pi$ -stacking energy onto energetic contributions from various physical factors [4-6], the role of entropic factors [7-9] and hydration [10] in aggregation of aromatic moieties, the origin of enthalpy-entropy compensation [11], and the problem of overall meaning of  $\pi$ -stacking [12].

Aromatic molecules is the most representative example of the  $\pi$ -stacking forming domains used as model systems to get insight into the nature of  $\pi$ -stacking interactions [1-6]. Recently [13] the most complete set of thermodynamical data on aggregation of small aromatic molecules (experimental enthalpy and entropy changes,  $\Delta H_{exp}$  and  $\Delta S_{exp}$ ) was reported collecting more than 50 self- ( $X+X$ ) and hetero-complexation ( $X+Y$ ) systems measured under comparable conditions of experiment (*i.e.* aqueous solution, pH~7,  $I\sim 0.1$ ). The uniqueness of this dataset, as compared to analogous thermodynamic data collections published before, is determined by two main features: (*i*) solution conditions are close to