

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ДИСУЛЬФИДИЗОМЕРАЗЫ С ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГУАНИДИНГИДРОХЛОРИДА

© И. М. Кузнецова,¹ Ольга В. Степаненко,¹ К. К. Туроверов,¹ Ч. Хуанг,² Ч.-Ч. Ванг²

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия,

и ² Национальная лаборатория биомолекул Китайской академии наук, Пекин 100101, Китай;

¹ электронный адрес: kkt@mail.cytspb.rssi.ru

Изучены процессы сворачивания—разворачивания дисульфидизомеразы С (DsbC) из *Escherichia coli* под действием GdnHCl. Анализ экспериментальных данных, полученных с помощью метода собственной флуоресценции, проводили совместно с анализом информации о пространственной структуре белка, содержащейся в Банке белковых структур (PDB). Показано, что атомы серы дисульфидной связи Cys 141—Cys 163 расположены далеко от индольного кольца Trp 140 и не могут выступать в роли тушителей триптофановой флуоресценции. В качестве потенциальных тушителей флуоресценции могут рассматриваться остатки Met 136 и His 170. Показано, что только три тирозиновых остатка (Tyr 171, Tyr 38 и Tyr 52) из восьми в каждой субъединице DsbC вносят вклад в суммарную флуоресценцию белка. Характер изменений интенсивности флуоресценции под действием GdnHCl (равновесные и кинетические зависимости), характер параметрической зависимости между интенсивностями флуоресценции, измеренными при длинах волн 320 и 365 нм, так же как и существование изобестической точки у спектров флуоресценции, измеренных при разных концентрациях GdnHCl, свидетельствуют об одностадийном характере денатурации DsbC под действием GdnHCl. Показана обратимость этого процесса.

Ключевые слова: дисульфидизомераза С, собственная флуоресценция, сворачивание—разворачивание белков.

Принятые сокращения: DsbC — дисульфидизомераза С, GdnHCl — гуанидингидрохлорид.

Вопрос в том, как полипептидная цепь сворачивается в компактную, высокоорганизованную и функционально активную белковую глобулу, является актуальной и все еще далекой от разрешения проблемой молекулярной и клеточной биологии. Актуальность проблемы обусловлена также ее практической значимостью для медицины и биотехнологии. Это связано с тем, что многие тяжелые заболевания, такие как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Якоба—Крейцфельта, прионные болезни и мн. др., связаны с неправильным фолдингом белков, приводящим к образованию амилоидных фибрилл (Harper, Lansbury, 1997; Carrell, Gooptu, 1998; Fink, 1998; Uversky et al., 1999). Для биотехнологии разработка этой проблемы существенна в связи с тем, что производству ряда ценных белковых препаратов часто препятствуют возникновение неправильно свернутых агрегированных форм рекомбинантных белков и их аккумуляция в телах включения (Wetzel, 1994; Speed et al., 1996; Fink, 1998). Основным подходом при исследовании фолдинга белков является изучение процессов их сворачивания—разворачивания и свойств, возникающих при этом промежуточных и неправильно свернутых состояний. Большинство работ по изучению сворачивания—разворачивания белков выполнено на небольших однодоменных белках. Значительный интерес представляет изучение фолдинга мультидоменных белков, к числу которых принадлежит дисульфидизомераза С (DsbC).

DsbC из *Escherichia coli* представляет собой растворимый белок бактериальной периплазмы, который отвечает за образование «правильных» дисульфидных связей во вновь синтезированных белках. В связи с этим DsbC считается бактериальным аналогом белка изомеразы дисульфидных связей (PDI) эндоплазматического ретикула эукариот (Zapun et al., 1995; Hiniker, Bardwell, 2003). Подобно PDI белок DsbC обладает шаперонной активностью, даже более выраженной, чем у PDI (Chen et al., 1999). Макромолекула DsbC имеет V-образную форму, в которой каждая ветвь представляет собой одну субъединицу гомодимера. Каждая субъединица состоит из N-концевого домена, ответственного за ассоциацию субъединиц, и C-концевого тиоредоксин-подобного (Trx) домена, связанных подвижной спиралью (McCarthy et al., 2000). Для изомеразной активности белка необходимы оба активных сайта (мотив Cys 98—Gly—Tyr—Cys 101), расположенных в двух Trx-доменах димерной молекулы DsbC. Для оксидоредуктазной активности требуется только один из активных сайтов (Sun, Wang, 2000). С помощью замещения Cys на Ser было показано, что дисульфидная связь в активном сайте необходима для ферментативной активности белка, но не требуется для его шаперонной активности, тогда как дисульфидная связь Cys 141—Cys 163 играет важную роль в фолдинге, стабильности и экспорте белка, а также существенна для его шаперонной активности (Liu, Wang,

2001). Каждая субъединица макромолекулы DsbC содержит только один триптофановый остаток (Trp 140), расположенный рядом с Cys 141, входящим в дисульфидную связь Cys 141—Cys 163, и восемь тирозиновых остатков.

Собственная УФ-флуоресценция белков широко используется для исследования процессов их сворачивания—разворачивания и свойств возникающих при этом промежуточных состояний. Информативность метода обусловлена высокой чувствительностью различных флуоресцентных характеристик (положения спектров флуоресценции, квантового выхода, анизотропии флуоресценции и др.) к свойствам микроокружения и особенностям локализации в макромолекуле белка триптофановых и тирозиновых остатков (Eftink, 1994; Turoverov et al., 2002; Turoverov, Kuznetsova, 2003).

В работе измерены стационарные и кинетические зависимости различных характеристик собственной флуоресценции DsbC в процессе сворачивания—разворачивания под действием GdnHCl. Результаты свидетельствуют о том, что денатурация DsbC является обратимым одностадийным процессом.

Материал и методика

Плазмиды рDsbC, содержащая полноразмерную кодирующую последовательность DsbC, была предоставлена д-ром Р. Глокшубером (Dr. R. Glockshuber, Eidgenossische Technische Hochschule, HONGGERBERG, Швейцария). При получении DsbC были использованы стандартные методики (Missiakas et al., 1994; Liu, Wang, 2001). Трансформированный JM83 (REP4) штамм *E. coli*, содержащий плазмиду рQE-30 (DsbC) (Liu et al., 1999), выращивали на среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампицилина и 25 мкг/мл канамицина. Ночную культуру разбавляли в 100 раз и инкубировали при 37 °C в течение 3 ч с последующей индукцией в присутствии 0.1 мМ изопропил-β-тиогалактопиранозиды. При получении растворимых периплазматических белков для разрушения клеток использовали осмотический шок. Полученный раствор подвергали диализу против буфера А (50 мМ Tris-HCl, pH 8.0), после чего пробы наносили на колонку Q-Сефарозы (Amersham Pharmacia Biotech, США). Белок элюировали буфером А с градиентом NaCl (0.0—0.4 М). Отбирали фракции, содержащие DsbC. Гомогенность фракций DsbC контролировали с помощью SDS-электрофореза в 15 %-ном полиакриламидном буфере. Отобранные фракции диализовали против 50 мМ NH₄HCO₃ и лиофилизировали. Концентрацию DsbC определяли по поглощению, при этом было принято, что оптическая плотность 0.1 %-ного раствора DsbC при длине волны 280 нм составляет 0.7 (Hiniker, Bardwell, 2003).

Очищенный DsbC имел одну полосу на электрофореграмме, его тиол-редуктазная активность, определенная на основании измерения временной зависимости мутности растворов при восстановлении инсулина (Holmgren, 1979; Martínez-Galisteo et al., 1993), составляла $2.67 \cdot 10^{-2} \Delta A_{650} \text{ нм} \cdot \text{мин}^{-2}$. Равновесные зависимости различных флуоресцентных характеристик DsbC от концентрации GdnHCl измеряли после инкубации белка (0.5 мг/мл) в растворах GdnHCl соответствующей концентрации при 4 °C в течение 24 ч. Во всех экспериментах использовали 0.1 М буфер Tris-HCl, pH 7.5.

Флуоресцентные измерения проводили при 23 °C с использованием спектрофлуориметра собствен-

ного изготовления (Туроверов и др., 1998). Если не указано дополнительно, измерение спектров флуоресценции выполняли при возбуждении светом с длиной волны 297 нм, с тем чтобы минимизировать вклад тирозиновых остатков в регистрируемую флуоресценцию белка. Для характеристики спектров флуоресценции использовали параметр $A = (I_{320} / I_{365})_{297}$ (I_{320} и I_{365} — интенсивности флуоресценции, измеренные при длинах волн 320 и 365 нм соответственно; Туроверов и др., 1998). Спектры флуоресценции и параметр A исправлены на спектральную чувствительность установки.

Все измерения кинетических зависимостей интенсивности флуоресценции выполнены с использованием микрокувет (101.016-QS 5 × 5 мм; Hellma, Германия). Денатурацию DsbC осуществляли добавлением 350 мкл раствора GdnHCl необходимой концентрации в кювету, содержащую 50 мкл раствора нативного белка. Ренатурацию DsbC инициировали добавлением 350 мкл 0.75 М GdnHCl в кювету, содержащую 50 мкл DsbC, предварительно денатурированного 3.12 М GdnHCl в течение 24 ч при 4 °C. Конечная концентрация GdnHCl в этих экспериментах составляла 1.05 М. Во всех экспериментах конечная концентрация белка составляла 0.5 мг/мл. Интенсивность флуоресценции при длинах волн 320 и 365 нм измеряли в течение 10 мин после добавления денатуранта. Мертвое время в этих экспериментах составляло не более 4 с (Kuznetsova et al., 2002a). Равновесную зависимость интенсивности флуоресценции измеряли через 12 ч после добавления денатуранта.

Анализ пространственной структуры белка. Расположение триптофановых и тирозиновых остатков в DsbC анализировали с использованием данных о координатах атомов пространственной структуры макромолекулы белка (файл 1EEJ.ent в PDB; Bernstein et al., 1977; McCarthy et al., 2000). Микроокружение триптофановых или тирозиновых остатков определяли как совокупность атомов, расположенных на расстоянии менее r_0 от геометрического центра индольного или фенольного кольца; r_0 равно 7 Å (Turoverov et al., 1985; Кузнецова, Туроверов, 1998). Определяли атомы микроокружения, ближайшие к каждому атому индольного или фенольного кольца, и расстояние между ними. Кроме того, определяли атомы, ближайшие к ОН-группам тирозиновых остатков. Плотность упаковки атомов в микроокружении определяли как число атомов, входящих в микроокружение, или как отношение объема, занимаемого атомами микроокружения, к общему объему сферы с радиусом 7 Å ($d = \sum V_i / V_0$). Объем, занимаемый каждым атомом (V_i), определяли на основании известных Ван-дер-Ваальсовых радиусов, причем учитывали лишь часть объема, входящую в микроокружение. Реальный объем, занимаемый атомами, немного меньше, так как атомы участвуют в образовании химических связей. Тем не менее для целей данного анализа это не имеет существенного значения.

Эффективность безызлучательного переноса энергии определяли из соотношения (Forster, 1960).

$$W = \frac{1}{1 + \frac{2/3}{k^2} \left(\frac{R}{R_0} \right)^6}, \quad (1)$$

где R_0 — расстояние между донором и акцептором, при котором для системы молекул донора и акцептора, участвующих в хаотическом броуновском движении, веро-

ятность переноса $W = 0.5$; R — расстояние между геометрическими центрами индольных (или фенольных) колец донора и акцептора, k^2 — фактор, учитывающий взаимную ориентацию донора и акцептора:

$$k^2 = (\cos\theta - 3\cos\theta_A\cos\theta_D)^2, \quad (2)$$

где θ — угол между направлениями осцилляторов излучения и поглощения молекул донора и акцептора соответственно, θ_A и θ_D — углы между направлениями указанных осцилляторов и вектором, соединяющим эти молекулы (Dale, Eisinger, 1974). Величины R_0 для пар Trp—Trp, Tyr—Trp, Tyr—Tyr и Trp—Tyr были взяты из литературы (Eisinger et al., 1969; Steinberg, 1971). Остальные величины определяли на основании координат атомов (Turoverov et al., 1985; Кузнецова, Туроверов, 1998; Turoverov, Kuznetsova, 2003). Расчет проводили в рамках моделей неподвижных строго ориентированных осцилляторов.

Результаты и обсуждение

Микроокружение триптофанового остатка. Каждая субъединица молекулы DsbC содержит единственный триптофановый остаток Trp 140, локализованный в α -спирали (Ser 130—Cys 141) C-концевого Tgx-подобного домена рядом с Cys 141, образующим дисульфидную связь с Cys 163 (рис. 1, а). Два триптофановых остатка белка разделены расстоянием в 55 Å, и между ними нет переноса энергии.

Каждый мономер DsbC содержит две дисульфидные связи: Cys 98—Cys 101 и Cys 141—Cys 163. Известно, что атомы серы, входящие в состав дисульфидной связи, являются эффективными тушителями флуоресценции (Кузнецова, Туроверов, 1998). Атомы серы Cys 98 и Cys 101 удалены от центра индольного кольца на 13.9 и 12.2 Å соответственно и не могут влиять на триптофановую флуоресценцию. Cys 141 является соседней аминокислотой для Trp 140. Так как боковые цепи двух соседних остатков ориентированы в противоположных направлениях от основной цепи белка, расстояния между атомами серы дисульфидной связи Cys 141—Cys 163 и индольным кольцом Trp 140 составляют 8.6 и 8.9 Å соответственно (рис. 1, б). Следовательно, ни один из атомов серы дисульфидных связей не может тушить триптофановую флуоресценцию DsbC.

Возможными тушителями триптофановой флуоресценции являются Met 136 и His 170 (рис. 1, б; табл. 1). Расстояние между CZ3-атомом Trp 140 и SD-атомом Met 136 составляет 4.10 Å, а расстояния между NE1-атомом Trp 140 и атомами ND1 и NE2 остатка His 170 составляют 4.19 и 4.70 Å соответственно. Возможное влияние на триптофановую флуоресценцию восьми атомов O и восьми атомов N пептидных связей в его микроокружении еще не совсем ясно. Вблизи Trp 140 нет молекул связанной воды, но есть много боковых цепей неполярных остатков (Ile 79, Thr 94, Leu 121, Ala 122, Ile 139, Val 165 и Ile 167) и два ароматических кольца (Tyr 120 и Phe 149) (табл. 1). Всего микроокружение Trp 140 насчитывает 82 атома ($d = 0.80$). Таким образом, микроокружение Trp 140 можно считать достаточно гидрофобным и плотно упакованным, что вполне согласуется с коротковолновым максимумом флуоресценции — 312 нм (рис. 2).

Микроокружение тирозиновых остатков. Каждый мономер DsbC содержит восемь тирозиновых

Таблица 1

Характеристика микроокружения триптофанового остатка Trp 140 дисульфидизомеразы C (DsbC)

Остатки микроокружения	Атомы, ближайшие к индольному кольцу	R , Å
Полярные группы		
Met 136	SD (CZ3)	4.10
His 170	ND1 (NE1)	4.19
	NE2 (NE1)	4.70
Неполярные группы и ароматические кольца		
Ile 79	CB, CG1, CG2, CD1	3.60
Thr 94	CG2	4.45
Tyr 120	CB , CG, CD2	4.02
Leu 121	CB, CD2	5.13
Ala 122	CB	3.71
Ile 139	CB, CG1, CG2 , CD1	3.99
Phe 149	CB, CG, CD2, CE2	4.06
Val 165	CB, CG1	4.22
Ile 167	CG1, CD1	4.40

Примечание. В случае полярных групп R — расстояние между S и Na атомами Met и His и ближайшим атомом индольного кольца (указан в скобках). В случае неполярных групп и ароматических колец представлены все атомы боковой цепи, входящие в микроокружение Trp 140, полужирным шрифтом выделены атомы, ближайшие к индольному кольцу, R — удаленность этих атомов от индольного кольца. Данные табл. 1 и 2 получены на основе анализа информации, содержащейся в Банке белковых структур (Bernstein et al., 1977), файл 1EEJ.ent (McCarthy et al., 2000).

остатков и один триптофановый. При возбуждении светом с длиной волны 280 нм спектр флуоресценции DsbC имеет максимум излучения при 302 нм (рис. 2). Сравнение спектров флуоресценции, измеренных при возбуждении светом с длинами волн 280 и 297 нм, показало, что в длинноволновой области спектры совпадают, но существенно различаются в коротковолновой области. Разностный спектр характеризует вклад тирозиновых остатков во флуоресценцию DsbC при возбуждении излучением с длиной волны 280 нм.

Для определения вклада отдельных тирозиновых остатков в суммарную флуоресценцию белка мы исследовали микроокружение каждого из них, а также перенос энергии между тирозиновыми остатками и от тирозиновых остатков к Trp 140. Свойства микроокружения отдельных тирозиновых остатков в DsbC существенно различаются (табл. 2). В микроокружении Tyr 100 имеется только 40 атомов и много молекул связанной воды; следовательно, этот тирозиновый остаток можно считать внешним и доступным для растворителя. Микроокружение Tyr 38, Tyr 81, Tyr 111 и Tyr 120 включает в себя 77, 72, 79 и 79 атомов соответственно, т. е. плотность микроокружения этих остатков заметно выше. Тот факт, что для всех тирозиновых остатков число атомов в микроокружении атома кислорода гидроксильных групп (табл. 2) меньше, чем в сфере с центром в геометрическом центре фенольного кольца, показывает, что гидроксильные группы всех тирозиновых остатков направлены к пери-

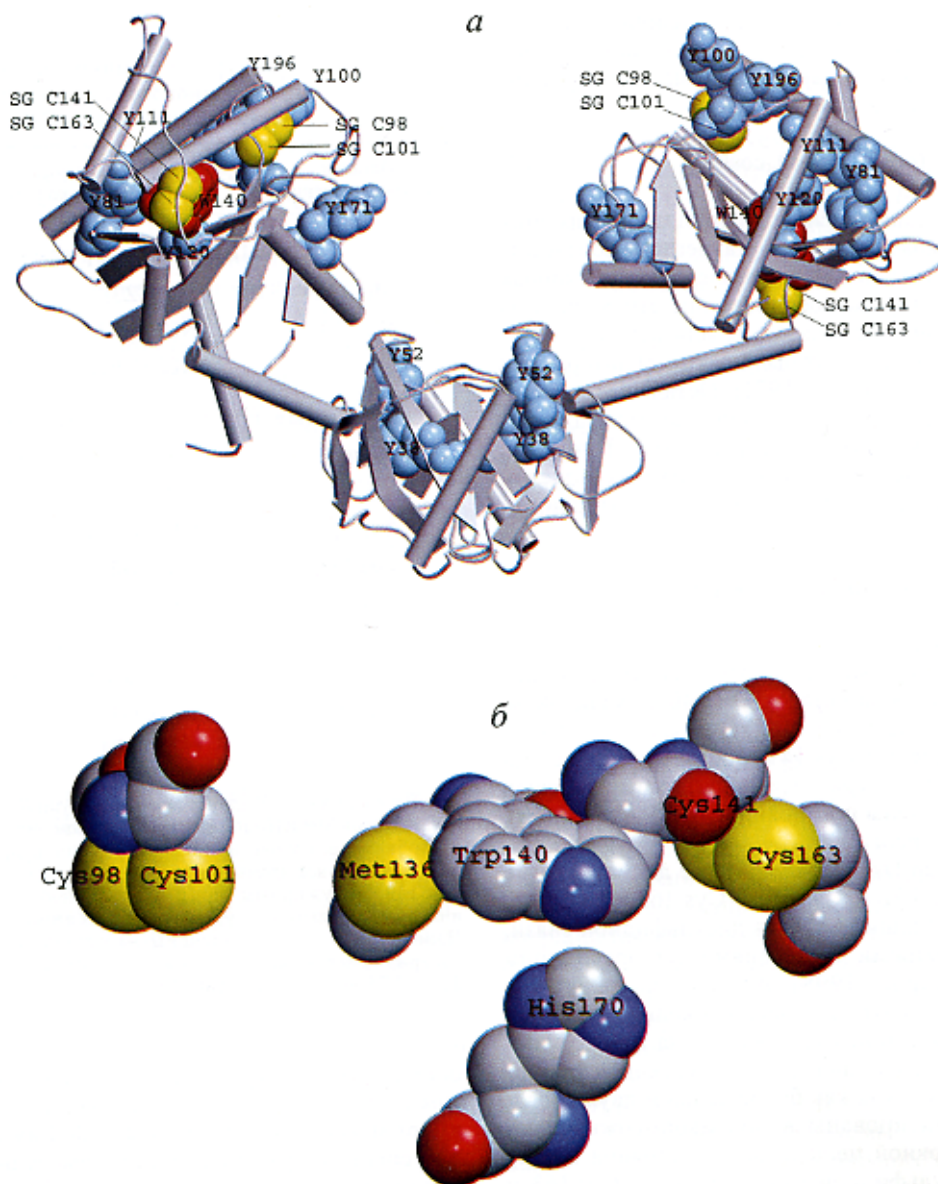


Рис. 1. Пространственная структура дисульфидизомеразы C (DsbC).

a — локализация триптофановых (красные) и тирозиновых (синие) остатков в структуре DsbC; атомы серы дисульфидных связей (желтые) показаны в виде сфер Ван-де-Ваальсова радиуса. *б* — локализация остатков Cys, Met и His — потенциальных тушителей Trp-флуоресценции вблизи Trp 140. Для построения изображений использовали графические программы VMD (Humphrey et al., 1996) и Raster 3D (Merritt, Bacon, 1977). Рис. 1 и 3 созданы на основании данных банка белковых структур (Bernstein et al., 1997), файл 1EEJ.ent (McCarthy et al., 2000).

ферии молекулы. Это справедливо прежде всего для Trp 52, Trp 100 и Trp 171, которые расположены близко от поверхности белка и имеют низкую плотность микроокружения. За исключением Trp 100 и Trp 171, в микроокружении шести других тирозиновых остатков есть много потенциальных тушащих групп, таких как SD-атомы Met 27, Met 51 и Met 66 и атом кислорода OD1 Asn 61 в микроокружении Trp 38, и атомы кислорода и азота Gln 48 и Asn 61 в микроокружении Trp 52. Тем не менее вклад Trp 38 и Trp 52 в суммарную флуоресценцию белка нельзя полностью исключать.

На рис. 3 показано, что существует эффективный перенос энергии от Trp 81, Trp 100, Trp 111 и Trp 120, локализованных в С-концевом домене, к Trp 140. Вероятность переноса энергии возбуждения от тирозиновых

остатков, локализованных в N-концевом домене, к Trp 140 невелика. Кроме того, нет переноса энергии между тирозиновыми остатками, расположенными в разных доменах. Скорее всего, Trp 196 не вносит значительного вклада во флуоресценцию. Во-первых, в его микроокружении много тушащих групп, таких как Lys 102, Glu 201 и Gln 107, NE2-атом которого непосредственно контактирует с OH-группой Trp 196. Во-вторых, энергия от Trp 196 может передаваться с высокой эффективностью ($W = 0.99$ и 0.91) к Trp 100 и Trp 111 соответственно и затем к Trp 140. В результате только Trp 171 может вносить существенный вклад в тирозиновую флуоресценцию DsbC.

Денатурация DsbC под действием GdnHCl. Стационарные зависимости. Спектры флуорес-

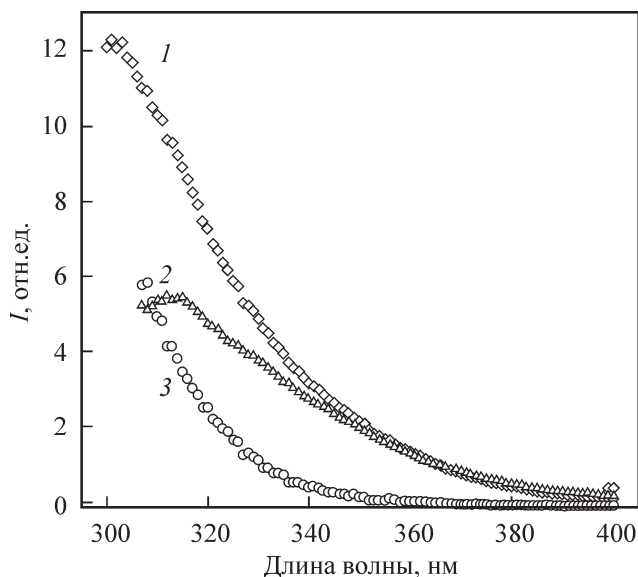


Рис. 2. Спектры флуоресценции нативного DsbC при возбуждении светом с длиной волны 280 (кривая 1) и 297 (кривая 2) нм.

Кривая 3 — вклад тирозиновых остатков во флуоресценцию белка.

цении DsbC не изменяются в области концентраций GdnHCl от 0 до 1.75 М, но постепенно сдвигаются в длинноволновую область при увеличении концентрации GdnHCl от 1.75 до 3.00 М, после чего остаются неизменными при дальнейшем увеличении концентрации GdnHCl до 6.0 М (рис. 4, а). В связи с этим можно предположить, что DsbC сохраняет нативную конформацию при концентрации GdnHCl ниже 1.75 М. Конформация DsbC изменяется при дальнейшем увеличении концентрации GdnHCl, и белок становится полностью развернутым при концентрации GdnHCl выше 3.0 М. Наличие изобестической точки при 340 нм для спектров флуоресценции, представленных в сравнимых единицах (рис. 4, б), свидетельствует о том, что разворачивание DsbC является одностадийным конформационным переходом.

Как показано на рис. 5, а, интенсивность флуоресценции DsbC при 320 нм в области концентраций GdnHCl от 0 до 1.75 М не меняется, но резко снижается до 28 %, когда концентрация GdnHCl увеличивается до 3.0 М. Дальнейшее увеличение концентрации GdnHCl не влияет на интенсивность флуоресценции (рис. 5, а, кривая 1). Напротив, интенсивность флуоресценции при 365 нм остается неизменной при концентрации GdnHCl и от 0 до 1.75 М и скачкообразно увеличивается в 3 раза при увеличении концентрации GdnHCl до 3.0 М. Дальней-

шее увеличение концентрации GdnHCl не влияет на интенсивность флуоресценции (рис. 5, а, кривая 2). Параметр *A* (рис. 5, б) и анизотропия флуоресценции (рис. 5, в) изменяются с увеличением концентрации GdnHCl подобно интенсивности флуоресценции при 320 нм.

Денатурация DsbC под действием GdnHCl. Кинетические зависимости. Временные зависимости интенсивности флуоресценции DsbC при 320 нм при денатурации GdnHCl разной концентрации представлены на рис. 6, а. Кинетические кривые в присутствии 0—1.75 М GdnHCl совпадают с кривой для нативного белка. В области концентраций GdnHCl от 3.0 до 6.0 М интенсивность флуоресценции очень быстро уменьшается до 28 % от флуоресценции нативного белка. В области от 1.75 до 3.00 М GdnHCl интенсивность флуоресценции уменьшается, приближаясь к величине, характерной для равновесия между нативным и развернутым состояниями при данной концентрации GdnHCl.

Анализ кинетических кривых денатурации DsbC был выполнен в рамках одностадийного перехода



где *N* — нативное состояние, *U* — развернутое состояние, *k*₁ и *k*₂ — константы скоростей прямой и обратной реакций соответственно. Относительная интенсивность флуоресценции *I*(*t*) определяется следующим соотношением:

$$I(k_i, t) = I_0 \left\{ 1 - \left(1 - \frac{I_U}{I_N} \right) \frac{k_1}{k_1 + k_2} (1 - \exp[-(k_1 + k_2)t]) \right\}, \quad (4)$$

где *I*_N и *I*_U — интенсивности флуоресценции нативного и развернутого состояний соответственно, *I*_U/*I*_N = 0.28 (см. выше), *I*₀ — интенсивность флуоресценции при *t* → 0. Величины констант скоростей *k*_{*i*} были определены методом наименьших квадратов путем минимизации функции

$$\Phi = \sum_i [I_{\text{exp}}(t) - (k_i, t)]^2. \quad (5)$$

Здесь *I*_{exp}(*t*) и *I*(*k*_{*i*}, *t*) — экспериментальная и расчетная величины относительной интенсивности соответственно. Для примера на рис. 6, б показаны экспериментальная кинетическая кривая, отражающая временные изменения интенсивности флуоресценции, и расчетная кривая, наилучшим образом отвечающая экспериментальным данным при *k*₁ = 0.949 и *k*₂ = 0.054 с⁻¹. Отклоне-

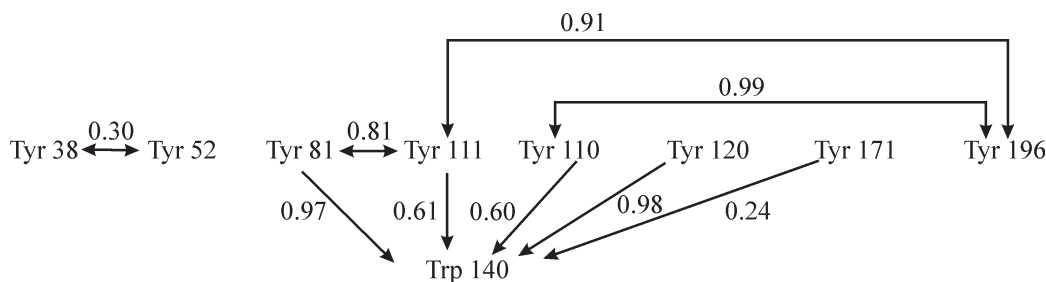


Рис. 3. Схема, характеризующая эффективность безызлучательного переноса энергии от тирозиновых остатков к остатку Trp 140 и между тирозиновыми остатками в DsbC.

Т а б л и ц а 2

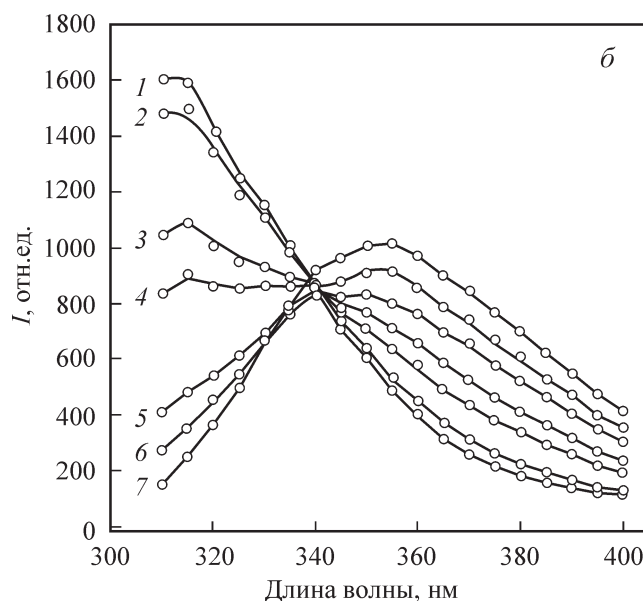
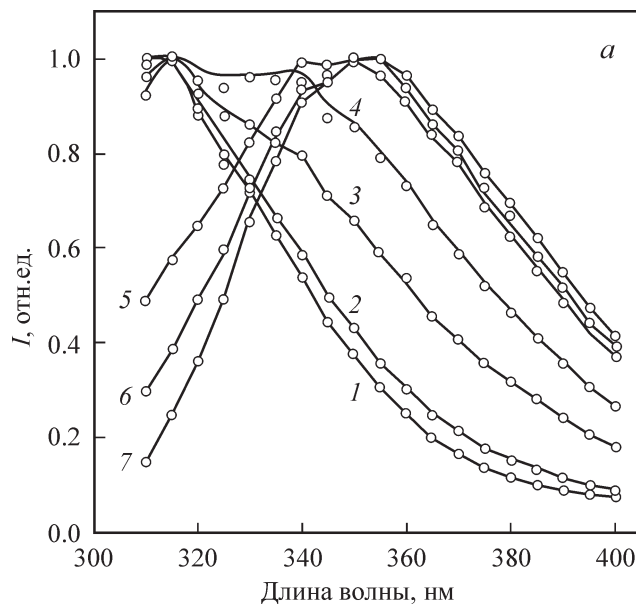
Характеристика микроокружения тирозиновых остатков DsbC

Тур	N	Потенциальные тушители Тург-флуоресценции	$R_C, \text{Å}$	$R_{OH}, \text{Å}$	Атомы кислорода связанной воды		
					$N_{НОН}$	$R_C, \text{Å}$	$R_{OH}, \text{Å}$
38	77 (73)	SD MET 27	5.74		209	4.40	2.90
		SD MET 51	4.56	4.51			
		OD1 ASN 61		6.04			
		SD MET 66		6.77			
52	61 (41)	OE1 GLN 48	5.46	4.28	1	6.33	5.71
		NE2 GLN 48		4.18	90	6.74	5.61
		OD1 ASN 61	5.22	5.65	119	4.32	4.77
		ND2 ASN 61		4.09	126	6.10	5.59
81	72 (73)	ND1 HIS 105	4.66	4.54	12	6.49	
		NE2 HIS 105	4.71	3.77	63	6.25	
		OD1 ASN 112	6.44		93	6.16	6.17
		OH TYR 120		6.31	102	5.80	6.82
		OD1 ASN 146	5.41	5.31			
		ND2 ASN 146	3.49	4.11			
		OD1 ASP 150	4.47	2.99			
		OD2 ASP 150	5.38	4.02			
100	40 (22)	NZ LYS 103	6.36	6.63	97	5.20	6.94
					138	4.12	2.67
					158	5.18	6.43
					169	5.39	4.67
					196	6.12	6.08
					201		5.12
111	79 (71)	OE1 GLN 107	6.31	5.61			
		NE2 GLN 107	5.70	4.43			
		OH TYR 196		4.61			
120	79 (72)	OH TYR 81		6.31	6	3.86	2.77
		ND1 HIS 105	4.35	2.86			
		NE2 HIS 105	6.05	4.93			
		SD MET 108	5.95	5.01			
171	62 (47)	SD MET 153		6.88			
					36	4.66	4.22
					107	6.43	5.10
					124	5.96	4.52
196	68 (60)	NZ LYZ 103	6.87				
		OE1 GLN 107	6.28	4.09	99	4.39	3.03
		NE2 GLN 107	4.58	2.78	138	6.25	
		OH TYR 111	4.56		167	5.08	4.89
		OE2 GLU 201		6.75	169	6.02	5.97
				201	6.48	5.30	

Примечание. N — число атомов в микроокружении тирозинового остатка, в скобках указано число атомов в микроокружении гидроксильной группы; $N_{НОН}$ — номер молекулы связанной воды; R_C и R_{OH} — расстояние от S-, N- или O-атомов потенциальных тушителей флуоресценции или атома кислорода связанной воды до геометрического центра фенольного кольца и атома кислорода гидроксильной группы тирозинового остатка соответственно.

Рис. 4. Спектры флуоресценции DsbC в растворах GdnHCl различной концентрации.

Спектры нормированы в максимуме (а) и представлены в сравнимых единицах (б). Кривая 1 — усредненный спектр флуоресценции DsbC в 0.0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50 и 1.75 М GdnHCl; кривые 2–6 — спектры флуоресценции в растворах 2.0, 2.2, 2.4, 2.6 и 2.8 М GdnHCl соответственно; кривая 7 — усредненный спектр флуоресценции DsbC в 3.0, 4.0, 5.0 и 6.0 М GdnHCl. $\lambda_{\text{возб.}} = 297$ нм.



ние экспериментальной кривой от расчетной носит случайный характер (рис. 6, в). Близость величины χ^2 ($\chi^2 = \Phi / (n - p)$, где n — число экспериментальных точек, p — число исследуемых параметров, к единице ($\chi^2 = 1.12$) и статистический характер отклонений доказывают обоснованность выбранной кинетической модели.

Эффективным подходом для изучения процессов сворачивания—разворачивания белков является построение параметрических зависимостей между двумя независимыми экстенсивными характеристиками системы (Bushmarina et al., 2001; Kuznetsova et al., 2002 a, 2002 b, 2004; Turoverov, Kuznetsova, 2003). Этот подход является удобным способом для решения вопроса о том, осуществляется процесс сворачивания—разворачивания белка по принципу «все или ничего» или он связан с образованием промежуточных состояний. Регистрируемая экспериментально параметрическая зависимость между любыми двумя экстенсивными характеристиками системы должна быть линейной, если при изменении параметра θ переход между состояниями 1 и 2 происходит по принципу «все или ничего» без образования промежуточных состояний. Если экспериментально зарегистрированная параметрическая зависимость двух экстенсивных характеристик системы не является линейной, то это однозначно свидетельствует о том, что переход исследуемого объекта из начального в конечное состояние не является одностадийным и происходит с образованием одного или нескольких промежуточных состояний.

Были построены параметрические зависимости между интенсивностями флуоресценции, измеренными на разных участках спектра флуоресценции (I_{320} и I_{365}). В качестве параметров выступали концентрация GdnHCl и время от начала денатурации белка под действием 2.4 М GdnHCl. Было показано, что обе параметрические кривые хорошо аппроксимируются прямой линией и совпадают друг с другом (рис. 7).

Ренатурация DsbC: кинетические зависимости. При уменьшении концентрации GdnHCl от 3.12

до 1.05 М интенсивность флуоресценции DsbC быстро увеличивается и достигает уровня нативного белка через 2—3 мин (рис. 8). При этом спектр флуоресценции

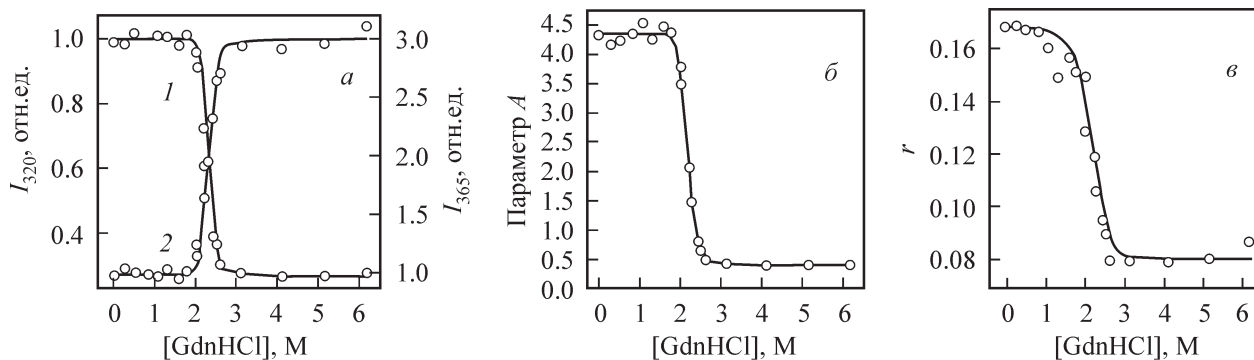


Рис. 5. Денатурация DsbC под действием GdnHCl.

а — интенсивность флуоресценции, измерения при 320 (кривая 1) и 365 (кривая 2) нм; б — параметр $A = I_{320} / I_{365}$; в — анизотропия флуоресценции r . $\lambda_{\text{возб.}} = 297$ нм.

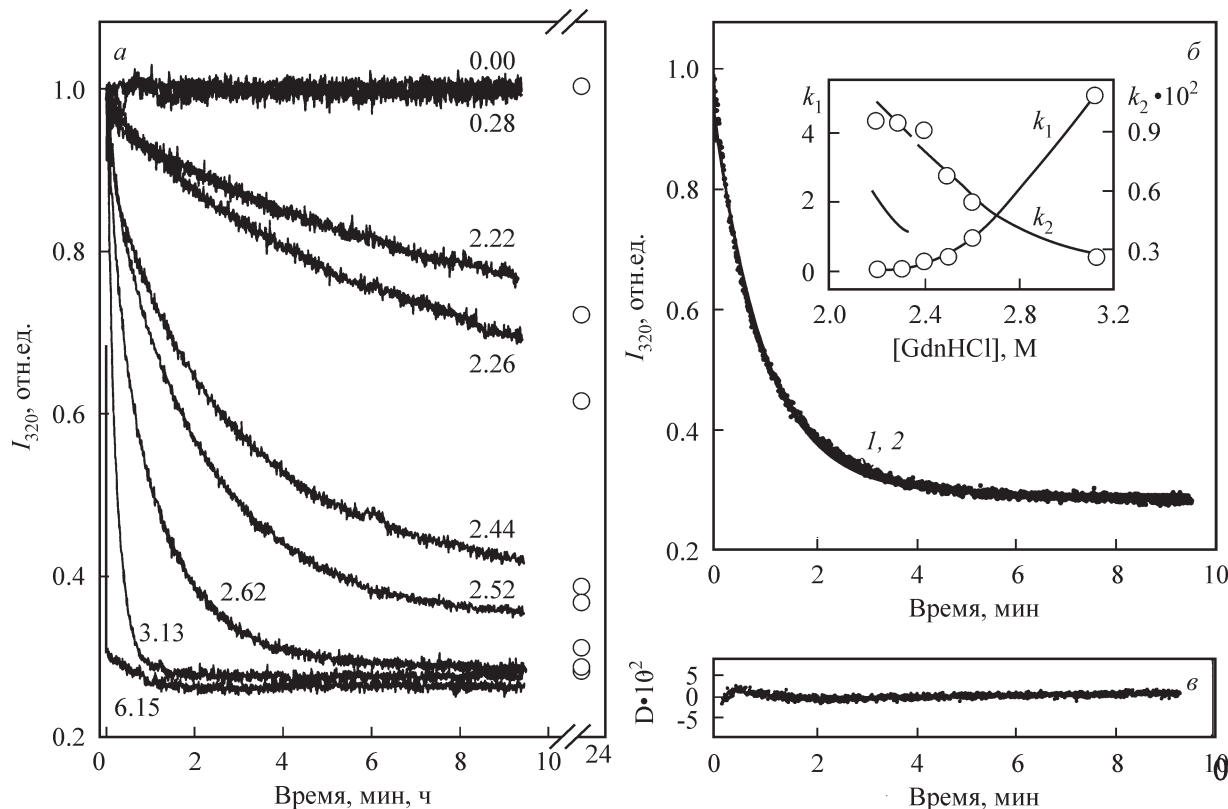


Рис. 6. Временные зависимости денатурации DsbC под действием GdnHCl.

a — изменение интенсивности флуоресценции DsbC при длине волны регистрации 320 нм. Цифры у кривых — концентрации GdnHCl. Концентрация белка 0.5 мг/мл, $\lambda_{\text{возб.}} = 297$ нм. *б* — анализ кинетической кривой разворачивания DsbC под действием 2.6 M GdnHCl; кривые 1, 2 — экспериментальная и расчетная кривые, отвечающие значениям констант скоростей $k_1 = 0.949$ и $k_2 = 0.054$ с⁻¹ соответственно. Вставка — зависимость констант скоростей k_i процесса денатурации DsbC от концентрации GdnHCl. *в* — отклонение экспериментальной кривой от расчетной. Концентрация белка 0.5 мг/мл.

нативного белка, переведенного в 1.0 M GdnHCl, и спектр флуоресценции белка, переведенного из 3.0 в 1.0 M GdnHCl, совпадают. Эти результаты свидетельствуют об обратимом характере процесса денатурации DsbC.

Таким образом, денатурация DsbC — двухдоменного димерного белка — является обратимой и осуществляется по принципу «все или ничего».

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект

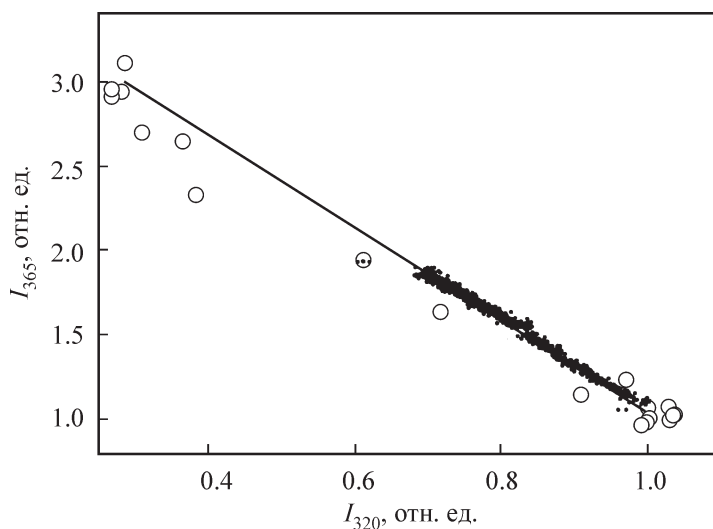


Рис. 7. Параметрическая зависимость между I_{320} и I_{365} , характеризующая процесс разворачивания DsbC под действием GdnHCl. Данные взяты из стационарных измерений (светлые кружки, параметр — концентрация GdnHCl) и кинетических измерений при денатурации DsbC 2.4 M GdnHCl (черные точки, параметр — время от начала процесса разворачивания). $\lambda_{\text{возб.}} = 297$ нм.

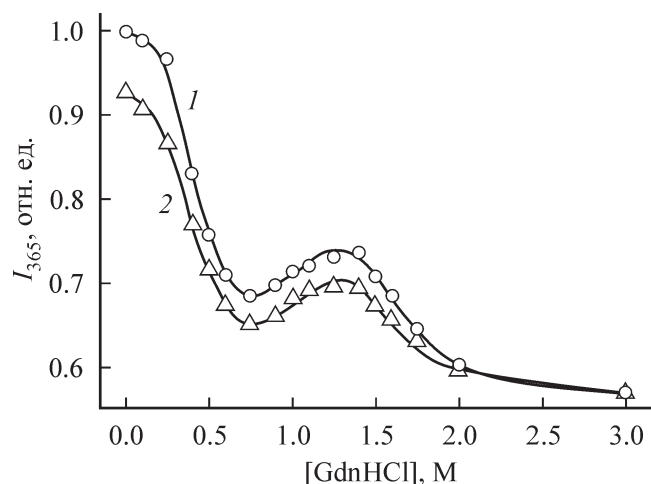


Рис. 8. Кинетические кривые денатурации и ренатурации DsbC.

a — разворачивание DsbC под действием GdnHCl; конечная концентрация GdnHCl 3.12 М. *б* — ренатурация DsbC, денатурированного 3.12 М GdnHCl; конечная концентрация GdnHCl 0.5 М. Сворачивание и разворачивание инициировали 8-кратным разбавлением раствора белка раствором GdnHCl необходимой концентрации. Конечная концентрация белка 0.5 мг/мл.

02-04-39009), Министерства науки и технологии Китая (грант G1999075608), INTAS (грант 2001-2347) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Кузнецова И. М., Туроверов К. К. 1998. Что определяет характеристики собственной УФ-флуоресценции белков? Анализ свойств микроокружения и особенностей локализации их триптофановых остатков. Цитология. 40 (8/9) : 747—762.
- Туроверов К. К., Бикташев А. Г., Дорофеюк А. В., Кузнецова И. М. 1998. Комплекс аппаратных и программных средств для измерения спектральных, поляризационных и кинетических характеристик флуоресценции в растворе. Цитология. 40 (8/9) : 806—817.
- Bernstein F. C., Koetzle T. F., Williams G. J. B., Meyer E. F., Jr., Brice M. D., Rodgers J. R., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M. 1977. The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. J. Mol. Biol. 112 : 535—542.
- Bushmarina N. A., Kuznetsova I. M., Biktashev A. G., Turoverov K. K., Uversky V. T. 2001. Partially folded conformations in the folding pathway of bovine carbonic anhydrase II: a fluorescence spectroscopic analysis. ChemBioChem. 2 : 813—821.
- Carrell R. W., Gooptu B. 1998. Conformational changes and disease-serpins, prions and Alzheimer's. Curr. Opin. Struct. Biol. 8 : 799—809.
- Chen J., Song J. L., Zhang S., Wang Y., Cui D. F., Wang C. C. 1999. Chaperone activity of DsbC. J. Biol. Chem. 274 : 19 601—19 605.
- Dale R. E., Eisinger J. 1974. Intramolecular distances determined by energy transfer. Dependence on orientational freedom of donor and acceptor. Biopolymers. 13 : 1573—1605.
- Eftink M. R. 1994. The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. Biophys. J. 66 : 482—501.
- Eisinger J., Feuer B., Lamola A. A. 1969. Intramolecular singlet excitation transfer. Applications to polypeptides. Biochemistry. 8 : 3908—3915.
- Fink A. L. 1998. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. Fold. Des. 3 : 9—23.
- Forster Th. 1960. Transfer mechanisms of electronic excitation energy. Rad. Res. Suppl. 2 : 326—339.
- Harper J. D., Lansbury P. T., Jr. 1997. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. Ann. Rev. Biochem. 66 : 385—407.
- Hiniker A., Bardwell C. A. 2003. Disulfide bond isomerization in prokaryotes. Biochemistry. 42 : 1179—1185.
- Holmgren A. 1979. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydroliipoamide. J. Biol. Chem. 254 : 9627—9632.
- Humphrey W., Dalke A., Schulten K. 1996. VMD: visual molecular dynamics. J. Mol. Graphics. 14 : 33—38.
- Kuznetsova I. M., Stepanenko Olga V., Stepanenko Olesia V., Povarova O. I., Biktashev A. G., Verkhusha V. V., Shavlovskiy M. M., Turoverov K. K. 2002a. The place of inactivated actin and its kinetic predecessor in actin folding—unfolding. Biochemistry. 41 : 13 127—13 132.
- Kuznetsova I. M., Stepanenko Olga V., Turoverov K. K., Zhu L., Zhou J.-M., Fink A. L., Uversky V. N. 2002b. Unraveling multistate unfolding of rabbit muscle creatine kinase. Biochim. biophys. acta. 1596 : 138—155.
- Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Uversky V. N. 2004. Use of the phase diagram method to analyze the protein unfolding—refolding reactions: fishing out the «invisible» intermediates. J. Proteome Res. 3 : 485—494.
- Liu X.-Q., Wang C.-C. 2001. Disulphide-dependent folding and export of *Escherichia coli* DsbC. J. Biol. Chem. 276 : 1146—1151.
- Liu X.-Q., Zhang S., Pan X.-M., Wang C.-C. 1999. A novel method of increasing production of mature proteins in the periplasm of *Escherichia coli*. Protein Sci. 8 : 2085—2089.
- Martinez-Galisteo E., Padilla C. A., Garcia-Alfonso C., Lopez-Barea J., Barcena J. A. 1993. Purification and properties of bovine thioredoxin system. Biochimie. 75 : 803—809.
- McCarthy A. A., Haebel P. W., Torronen A., Rybin V., Baker E. N., Metcalf P. 2000. Crystal structure of the protein disulfide bond isomerase, DsbC, from *Escherichia coli*. Nat. Struct. Biol. 7 : 196—199.
- Merritt E. A., Bacon D. J. 1977. Raster 3D: photorealistic molecular graphics. Methods in Enzymo. 277 : 505—524.
- Missiakas D., Georgopoulos C., Raina S. 1994. The *Escherichia coli* DsbC (xprA) gene encodes a periplasmic protein involved in disulphide bond formation. EMBO J. 13 : 2013—2020.
- Speed M. A., Wang D. I., King J. 1996. Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition. Nat. Biotechnol. 14 : 1283—1287.
- Steinberg I. Z. 1971. Long-range nonradiative transfer of electronic excitation energy in proteins and polypeptides. Ann. Rev. Biochem. 40 : 83—114.
- Sun X. X., Wang C. C. 2000. The N-terminal sequence (residues 1—65) is essential for dimerization, activities, and peptide binding of *Escherichia coli* DsbC. J. Biol. Chem. 275 : 22 743—22 749.

Turoverov K. K., Kuznetsova I. M. 2003. Intrinsic fluorescence of actin. *J. Fluorescence*. 13 : 41—57.

Turoverov K. K., Kuznetsova I. M., Zaitzev V. N. 1985. The environment of the tryptophan residue in *Pseudomonas aeruginosa* azurin and its fluorescence properties. *Biophys. Chem.* 23 : 79—89.

Turoverov K. K., Verkhusha V. V., Shavlovsky M. M., Biktashev A. G., Povarova O. I., Kuznetsova I. M. 2002. Kinetics of actin unfolding induced by guanidine hydrochloride. *Biochemistry*. 41 : 1014—1019.

Uversky V. N., Talapatra A., Gillespie J. R., Fink A. L. 1999. Protein deposits as the molecular basis of amyloidosis. *Med. Sci. Monitor*. 5 : 1001—1012; 1238—1254.

Wetzel R. 1994. Mutations and off-pathway aggregation of proteins. *Trends Biotechnol.* 12 : 193—198.

Zapun A., Missiakas D., Raina S., Creighton T. E. 1995. Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 34 : 5075—5089.

Поступила 24 V 2005

CONFORMATIONAL CHANGES OF DISULFIDE ISOMERASE C INDUCED BY GUANIDINE HYDROCHLORIDE

I. M. Kuznetsova,¹ Olga V. Stepanenko,¹ K. K. Turoverov,¹ C. Huang,² C.-C. Wang²

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia, and ² National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China;

¹ e-mail: kkt@mail.cytspb.rssi.ru

Unfolding—refolding of *Escherichia coli* disulfide isomerase C (DsbC) induced by GdnHCl was studied by intrinsic fluorescence. Interpretation of experimental fluorescence data was done together with the analysis of protein 3D structure. It is shown that although Cys 141 is the next neighbour of a single tryptophan residue Trp 140, sulfur atoms of the disulfide bond Cys 141—Cys 163 are far apart from the indole ring and cannot quench its fluorescence, while the potential quenchers are Met 136 and His 170. It has been revealed that, though each subunit of DsbC contains eight tyrosine residues, only three tyrosine residues (Tyr 171, Tyr 38 and Tyr 52) contribute to the bulk fluorescence of the molecule. The character of intrinsic fluorescence intensity changes induced by GdnHCl (equilibrium and kinetic data), the character of parametric dependencies between fluorescence intensity recorded at 320 and 365 nm, and the existence of an isosbestic point of protein fluorescence spectra in solutions with different GdnHCl concentrations, allowed suggesting a one-step character of DsbC denaturation. The reversibility of this process is also shown.

Key words: disulfide isomerase C, intrinsic fluorescence, folding—unfolding of proteins.