

УДК 577.322.52

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ ДИМЕРИЗАЦИИ НА СТРУКТУРУ И ГИДРОФОБНОСТЬ РНКАЗЫ *BACILLUS INTERMEDIUS*

Н.В. Калачева, В.П. Губская, В.А. Миронов,
О.Н. Ильинская, Б.М. Куриненко

Аннотация

Получена димерная форма РНКазы *Bacillus intermedius* путем ковалентного связывания молекул мономера бифункциональным реагентом диметилсуберимидатом. По спектру кругового дихроизма определена вторичная структура РНКазы после димеризации. Содержание элементов вторичной структуры у димерной формы РНКазы изменяется по сравнению с мономером. У димера снижается содержание β -структур, в то время как количество α -спиральных участков остается неизменным. Показано, что уменьшение содержания β -структур в молекуле димера обусловлено частичным разворачиванием белковой глобулы РНКазы, которое является следствием щелочной денатурации фермента в процессе димеризации. Определение константы распределения мономерной и димерной форм РНКазы в двухфазной системе бутанол/вода показало, что у димерной формы РНКазы Vi имеет место увеличение гидрофобности. Рассмотрены особенности структуры димеризованной РНКазы с позиций перспектив усиления взаимодействия препарата с цитоплазматической мембраной клетки.

Ключевые слова: РНКаза *Bacillus intermedius*, димер, спектр кругового дихроизма, вторичная структура, гидрофобность.

Введение

Большой интерес у исследователей вызывают олигомерные формы РНКаз: димеры, тримеры, тетрамеры, которые могут иметь ряд активностей, не наблюдаемых у исходных мономерных форм [1–3]. Так, олигомерные формы панкреатической РНКазы, в отличие от мономера, проявляют противоопухолевую активность по отношению к определенным видам опухолей [3]. Цитотоксические и каталитические свойства димеров и мультимеров коррелируют с их молекулярной массой, а также с количеством и плотностью положительных зарядов, присутствующих в белке. Особенности структуры олигомеров определяют их более эффективное взаимодействие с различными мишенями – отрицательно заряженными молекулами плазматической мембраны и различными видами РНК, – а также более эффективную интернализацию. Недостатком олигомерных форм является их нестабильность, поскольку они формируются за счет нековалентных связей между мономерами [3]. Этот недостаток можно устранить путем ковалентного связывания молекул белка с помощью бифункциональных реагентов.

Объектом настоящего исследования являлась РНКаза *Bacillus intermedius* (РНКаза Vi), на основе которой был получен димер, химически «сшитый» диметилсуберимидатом. Выбор РНКазы Vi обусловлен целым рядом проявляемых ею

биологических свойств, в том числе и цитотоксических [4, 5]. Кроме того, в опубликованных ранее работах нами было показано, что РНКазы Vi в димерной форме воздействует на цитоплазматическую мембрану более эффективно, чем мономер [6]. Поскольку химическая модификация белка может сопровождаться изменением его структуры, целью работы являлось определение вторичной структуры РНКазы Vi после ее димеризации по спектру кругового дихроизма и анализ особенностей этой структуры с позиций усиления гидрофобных свойств и перспектив взаимодействия препарата с цитоплазматической мембраной клетки.

1. Методика

Фермент РНКазы *Bacillus intermedius* Vi (КФ 3.1.4.23) представляет собой основной белок с молекулярной массой 12.3 кДа, изоэлектрической точкой рI 8.9. и максимальной каталитической активностью при рН 8.5. В экспериментах использовали гомогенный препарат микробной РНКазы Vi, полученный по методу [7]. Определена первичная структура РНКазы Vi [8]. Известны вторичная [9] и третичная [10] структуры белка.

Получение димерной формы РНКазы. Димер получали путем «сшивания» РНКазы Vi диметилсуберимидатом согласно [11]. К перемешиваемому раствору, содержащему 100 мг РНКазы в 10 мл 0.1 М натрий-фосфатного буфера рН 10.0, при 25 °С добавляли 10 мг диметилсуберимидата гидрохлорида “Sigma” (США) в твердом виде порциями примерно по 2 мг с 5-минутными интервалами, рН раствора сохраняли добавлением 0.1 М NaOH. После 1-го часа реакцию останавливали добавлением 2 мл 0.2 М ацетата аммония. Фракции мономера, димера, тримера и полимера рибонуклеазы выделяли из реакционной смеси гельфильтрацией на колонке с сефадексом G-75 (элюент – 0.02 М аммоний-ацетатный буфер рН 4.5) и лиофильно высушивали.

Расчет выхода по белку и РНКазной активности димера РНКазы производили по показаниям $D_{\text{опт}}$ и РНКазной активности соответственно относительно данных для нативного фермента. Рибонуклеазную активность определяли по количеству кислоторастворимых продуктов, образовавшихся при ферментативном гидролизе дрожжевой РНК [12]. Активность РНКазы Vi составляла $1.6 \cdot 10^6$ ед/мг. Удельная активность димера РНКазы Vi снижалась на 44% по сравнению с мономерной формой.

Снятие спектров КД. Спектры КД снимали на спектрополяриметре J-500A “Jasco” (Япония) в кюветах 0.1 см при концентрации фермента 0.5 мг/мл и температуре 24 °С. Измерения проводили в водном растворе при рН 5.5. В качестве денатурирующего агента использовали мочевины марки «хч». Спектры КД РНКазы Vi при рН 10.0 снимали в растворе 0.05 М Na-фосфатного буфера с соответствующим рН. Полученные данные выражали в виде молярной эллиптичности (θ), которую рассчитывали по формуле: $\theta = 330\Delta D \cdot M / (l \cdot C)$, где ΔD – разность оптического поглощения право- и левополяризованных по кругу составляющих, M – средняя молекулярная масса одного аминокислотного остатка белка, l – длина оптического пути (дм), C – концентрация белка (дмоль/л) [9]. Анализ содержания различных белковых структур, входящих в состав моно-

мерной и димерной форм РНКаз, проводили по методу, описанному Болотиной и Лугаускас [13], с использованием программы MATLAB. Для расчета использовали известные реперные спектры КД различных белковых структур [9]. Экспериментальные спектры КД белков представляли в виде линейной комбинации реперных спектров белковых структур и спектра, описывающего суммарный вклад ароматических аминокислотных остатков, который был вычислен в работе [14]. Оценки параметров, полученные в результате множественной линейной регрессии, нормировали без учета вклада ароматических аминокислотных остатков, в результате чего были получены искомые молярные доли содержания белковых структур (доверительные интервалы для средних значений рассчитаны по уровню значимости $\alpha = 0.05$).

Распределение в двухфазной системе бутанол/вода. Равные объемы хроматографически чистого бутанола и водного раствора белка с известной оптической плотностью смешивали и встряхивали в течение 1 мин, а затем центрифугировали при 12000 об/мин в течение 5 мин для разделения фаз. Измеряли поглощение D_{280} в бутаноле и водной фазе и рассчитывали коэффициент распределения по формуле:

$$K_{\text{распр}} = D_{280}(\text{фермент в бутаноле}) / D_{280}(\text{фермент в воде}).$$

Расчет гидрофобности. Суммарную гидрофобность аминокислотных остатков РНКазы Vi и РНКазы А рассчитывали, используя величины гидрофобности аминокислотных остатков, приведенные в классической работе Волькенштейна [15]. За количественную меру гидрофобности принимали величину изменения свободной энергии ΔF , ккал/моль, приходящуюся на боковую группу свободной аминокислоты при переносе аминокислоты из C_2H_5OH в воду.

2. Результаты и их обсуждение

В спектрах КД препаратов мономерной и димерной форм РНКазы Vi имеются три максимума: два отрицательных (212 и 227 нм) и один положительный (199 нм) (рис. 1, а). Поскольку соотношение *сигнал – шум* в области положения полосы с положительным максимумом минимальное, в спектрах приводятся приближенные значения. Полосы спектров в области 210–240 нм отражают электронные переходы в пептидных группах основных структур белков (α -спирали, антипараллельная и параллельная β -структуры, β -изгибы и нерегулярные участки). Эта так называемая «пептидная» часть спектра совпадает с описанной в литературе для мономерного фермента [9]. Спектр димера от спектра мономера существенно не отличается, за исключением полосы при экстремуме 227 нм, амплитуда которой увеличивается по сравнению с мономером (рис. 1, б).

Рассчитано, что мономер РНКазы Vi содержит 0.22 молярной доли α -спиралей, 0.16 – β -структур, 0.20 – β -изгибов и 0.42 – неупорядоченных участков (табл. 1). Полученные нами расчетные данные по вторичной структуре РНКазы Vi были сопоставлены с известными в литературе [13]. Из результатов рентгеноструктурного анализа следует, что в РНКазе Vi в α -спиральных участках находятся 0.20 молярной доли аминокислотных остатков, а в β -структурах – 0.22;

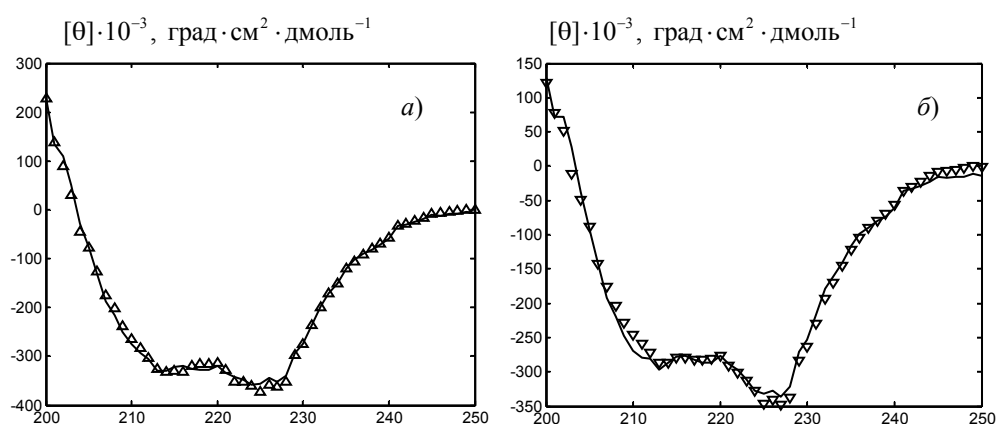


Рис. 1. Спектры КД мономерной (а) и димерной (б) форм РНКазы Vi. Концентрация препаратов составляла 0.5 мг/мл, рН 5.5. Треугольниками обозначен экспериментальный спектр, сплошной линией – теоретически рассчитанный

Табл. 1

Содержание различных элементов вторичной структуры (%) в мономерной и димерной формах РНКазы Vi

Препарат	α -спиральная структура	β -структура (антипараллельная + параллельная)	β -изгибы	Неупорядоченная структура
Мономер РНКазы Vi при рН 5.5	22 ± 1.0	16 ± 1.8	20 ± 2.1	42 ± 5.2
Димер РНКазы Vi при рН 5.5	21 ± 1.1	11 ± 2.0	21 ± 3.1	47 ± 7.1
Мономер РНКазы Vi при рН 10.0	21 ± 2.0	10 ± 2.0	23 ± 4.1	46 ± 9.0
Мономер РНКазы Vi в 3 М мочеvine	23 ± 2.5	10 ± 2.4	24 ± 5.1	43 ± 8.2

по спектрам КД при рН 4.8 – 0.18 и 0.18 молярных долей этих структур соответственно, а также 0.24 – β -изгибов и 0.40 – неупорядоченных участков [13]. Таким образом, данные по содержанию элементов вторичной структуры у мономера РНКазы Vi, полученные нами, мало отличаются от имеющихся в литературе. Некоторое несоответствие в содержании β -структур объясняется различиями в степени очистки препаратов РНКазы.

У димерной формы РНКазы Vi содержание элементов вторичной структуры изменяется по сравнению с их содержанием в мономерной (табл. 1). У димера наблюдается снижение содержания β -структур, в то время как количество α -спиральных участков не меняется. Уменьшение количества β -структур у димера превышает допустимую погрешность применяемого нами метода.

Получение димера РНКазы Vi осуществлялось нами в достаточно жестких условиях (рН 10.0 в течение 1 ч), и они могли оказать влияние на структуру белка. Действительно, анализ спектра КД мономера при рН 10.0 показал, что в этих условиях разрушается до 33% β -структур, в то время как количество α -спиральных участков остается неизменным (рис. 2, а; табл. 1). Аналогичные

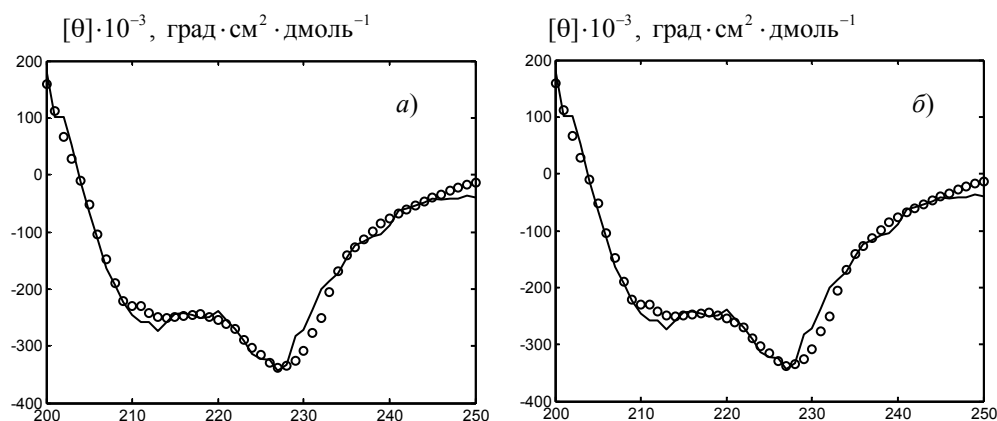


Рис. 2. Спектры КД мономерной формы РНКазы Vi при pH 10.0 (а) и в 3 М мочевины (б). Концентрация препаратов составляла 0.5 мг/мл. Кружками обозначен экспериментальный спектр, сплошной линией – теоретически рассчитанный

результаты были получены и при анализе спектра КД мономерной формы фермента в растворе денатурирующего агента – 3 М мочевины (рис. 2, б; табл. 1). Таким образом, можно сказать, что щелочные условия димеризации РНКазы Vi вызывают денатурацию фермента, которая сопровождается разворачиванием белковой глобулы. Это состояние структуры мономера фиксируется бифункциональным реагентом. В результате мы получаем димер с частично развернутой белковой структурой. Показателем изменения структуры РНКазы Vi является снижение удельной активности димера на 44% по сравнению с мономером и уменьшение у него содержания β-структур.

Разрушение β-структуры, даже не очень значительное, может привести к экспонированию одного или нескольких ароматических остатков аминокислот, находящихся в гидрофобной части β-структуры, и оказать влияние на локальное окружение ароматических боковых радикалов, включенных в области с нерегулярной конформацией. Такие изменения в молекуле димера должны сопровождаться, с одной стороны, изменением третичной структуры и электростатических свойств белка, с другой – увеличением его гидрофобности.

Частичное разворачивание белковой глобулы РНКазы Vi в процессе ее димеризации создает благоприятные условия для взаимодействия «гидрофобного ядра» молекулы с липидами мембран клетки. Расчет гидрофобности молекулы РНКазы Vi в сравнении с таковым для РНКазы А показал, что различия в суммарной ΔF для остатков, предположительно расположенных на поверхности молекулы, незначительны (рис. 3). Гидрофобность ядра РНКазы Vi почти в 1.5 раза превышала таковую для панкреатической РНКазы. Сумма ΔF для всех аминокислотных остатков, входящих в состав белков, также оказалась больше для РНКазы Vi. По-видимому, отсутствие цистеина в гуанилспецифических РНКазах микробного происхождения и, как следствие, невозможность образования дисульфидных связей компенсируются наличием сильного гидрофобного ядра, стабилизирующего молекулу белка [16]. Поскольку согласно спектрам КД в процессе димеризации происходит частичное разворачивание молекулы мономера, появляется вероятность увеличения гидрофобных свойств димера, проявление

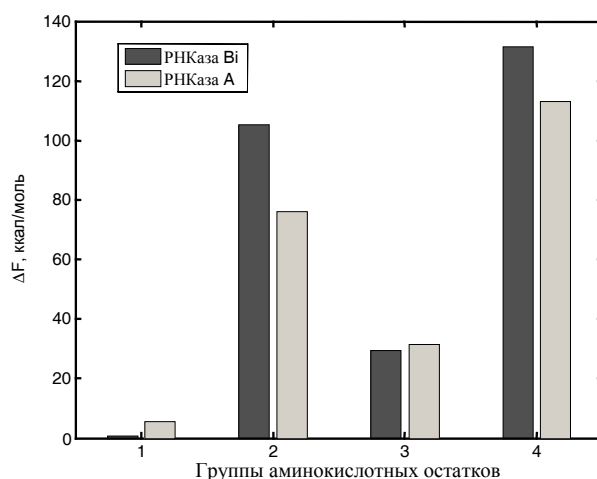


Рис. 3. Суммарная гидрофобность аминокислотных остатков РНКазы Vi и РНКазы A: 1 – нейтральные остатки, 2 – гидрофобные, 3 – гидрофильные, 4 – все аминокислотные остатки белка

которых будет тем сильнее, чем выше гидрофобность белковой молекулы. Определение константы распределения мономерной и димерной форм РНКазы в двухфазной системе бутанол/вода показало, что у димерной формы РНКазы Vi действительно имеет место усиление гидрофобных свойств ($K_{\text{распр. мономера}} = 0.46$; $K_{\text{распр. димера}} = 0.95$).

Усиление гидрофобности, наряду с увеличением молекулярной массы, должно способствовать более эффективному связыванию димера с плазматической мембраной клетки. Характер взаимодействия цитотоксичного белка с клеточной мембраной во многом определяет гидрофильно-гидрофобный баланс. Механизм этого взаимодействия состоит из двух этапов: электростатическое взаимодействие положительно заряженных аминокислотных остатков с отрицательно заряженными участками мембраны и последующее внедрение гидрофобных регионов белка в гидрофобное пространство липидного бислоя. Результатом такого внедрения могут быть различного рода изменения, а именно усиление тропности белка к мембране, нарушение структуры мембраны, изменение толщины липидного бислоя или формирование пор и каналов [17].

3. Выводы

Таким образом, химическая димеризация РНКазы Vi приводит к частичному разворачиванию структуры молекул мономеров, формирующих димер. Следствием такого изменения структуры является усиление гидрофобности димерной формы РНКазы по сравнению с мономерной. Это объясняет более эффективное воздействие димера на цитоплазматическую мембрану клеток по сравнению с воздействием мономера, описанным нами ранее [6]. Усиление гидрофобности димера должно способствовать интернализации фермента в клетку, а сохранение у димера более 50% удельной активности исходного фермента, важной для цитотоксического действия, дает основание для исследования его цитотоксических свойств, в том числе и противоопухолевой активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦНТП (ГК 02.740.11.0391) и РФФИ (проект № 07-04-01051).

Summary

N.V. Kalacheva, V.P. Gubskaya, V.A. Mironov, O.N. Ilinskaya, B.M. Kurinenko. Influence of Chemical Dimerization on the Structure and Hydrophobicity of RNase *Bacillus intermedius*.

Dimeric RNase from *Bacillus intermedius* is obtained by means of covalent bonding of monomers by bifunctional reagents, e. g., dimethylsuberimidate. The secondary structure of the dimer is obtained via circular dichroism spectrum. The content of secondary structure elements for the dimeric form of RNase is different from that for the native form. The amount of β -structure is reduced for the dimer, while that of α -helices is not changed in fact. It is shown that this reduction is due to partial unfolding of protein globule which is caused by the alkaline denaturation of the enzyme during dimerization. The determination of the distribution constant for the monomer and dimer forms of RNase in the system butanol/water shows that hydrophobicity is increased for the dimer form of RNases Bi. The peculiarities of the dimer structure are discussed from the viewpoint of possible enhancement of interaction between the preparation and cytoplasmatic cell membrane.

Key words: RNase from *Bacillus intermedius*, dimer, circular dichroism spectrum, secondary structure, hydrophobicity.

Литература

1. *Matousek J., Gotte G., Pouskova P., Sousek J., Slavik T., Vottariello F.* Antitumor and other biological actions of oligomers of ribonuclease A // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278, No 44. – P. 23817–23822.
2. *Libonati M.* Biological actions of the oligomers of ribonuclease A CMLS // *CMLS. Cell. Mol. Life Sci.* – 2004. – V. 61. – P. 2431–2436.
3. *Libonati M., Gotte G.* Oligomerization of bovine ribonuclease A: structural and functional features of its multimers // *Biochem. J.* – 2004. – V. 380. – P. 311–327.
4. *Куриненко Б.М.* Механизмы биологического действия нуклеаз // *Лещинская И.Б., Варламов В.П., Куриненко Б.М.* Нуклеазы бактерий. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1991. – С. 153–230.
5. *Ильинская О.Н., Макаров А.А.* Почему рибонуклеазы вызывают гибель раковых клеток // *Молекул. биол.* – 2005. – Т. 39, № 1. – С. 3–13.
6. *Калачева Н.В., Коновалова О.А., Налимов Д.С., Салахов М.Х., Ильинская О.Н., Куриненко Б.М.* Ингибирование фагоцитарной функции макрофагов *in vitro* димерной формой рибонуклеазы *Bacillus intermedius* // *Цитология.* – 2008. – Т. 50, № 6. – С. 487–491.
7. *Голубенко И.А., Балабан Н.П., Лещинская И.Б., Волкова Т.И., Клейнер Г.И., Чепурнова Н.К., Афанасенко Г.А., Дудкин С.М.* Рибонуклеаза *Bacillus intermedius* 7P. Очистка хроматографией на фосфоцеллюлозе и некоторые характеристики гомогенного фермента // *Биохимия.* – 1979. – Т. 44, № 4. – С. 640–648.
8. *Афанасенко Г.А., Дудкин С.М., Каминир Л.Б.* Первичная структура рибонуклеазы *Bacillus intermedius* // *Биоорган. химия.* – 1979. – Т. 5, № 2. – С. 187–202.
9. *Болотина И.А., Дудкин С.М., Лугаускас В.Ю., Ханданян А.Ж., Лещинская И.Б.* Рибонуклеаза *Bacillus intermedius*. Определение вторичной структуры в растворе методом КД // *Биоорган. химия.* – 1979. – Т. 5, № 2. – С. 203–209.

10. Pavlovsky A.G., Vagin A.A., Vainstain B.K., Chepurnova N.K., Karpeisky M.Y. Three dimensional structure of ribonuclease from *Bacillus intermedius* 7P at 3.2 Å resolution // FEBS Lett. – 1983. – V. 162, No 1. – P. 167–170.
11. Wang D., Wilson G., Moore S. Preparation of cross-linked dimers of pancreatic ribonuclease // Biochem. – 1976. – V. 15, No 3. – P. 660–665.
12. Лецинская И.Б., Балабан Н.П., Капранова М.Н., Голубенко И.А. Методы определения нуклеаз и родственных ферментов // Современные методы изучения нуклеиновых кислот и нуклеаз микроорганизмов. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1980. – С. 53–60.
13. Болотина И.А., Лугаускас В.Ю. Определение вторичной структуры белков из спектров кругового дихроизма. IV. Учет вклада ароматических аминокислотных остатков в спектры кругового дихроизма белков в пептидной области // Молекул. биол. – 1985. – Т. 19, № 5. – С. 1409–1421.
14. Гришина И.Б., Болотина И.А., Есипова Н.Г., Павловский А.Г., Макаров А.А. Локализация энергетических доменов в рибонуклеазе *Bacillus intermedius* 7P // Молекул. биол. – 1989. – Т. 23, № 5. – С. 1455–1468.
15. Волькенштейн М.В. Молекулярная биофизика. – М.: Наука, 1985. – 616 с.
16. Fersht A.R., Matouschek A., Serrano L. The folding of an enzyme. I. Theory of protein engineering analysis of stability and pathway of protein folding // J. Mol. Biol. – 1992. – V. 224, No 3. – P. 771–782.
17. Ostolaza H., Bakas L., Goni F.M. Balance of electrostatic and hydrophobic interactions in the lysis of model membranes by *E. coli* α -haemolysin // J. Membr. Biol. – 1997. – V. 158, No 2. – P. 137–145.

Поступила в редакцию
28.12.09

Калачева Наталия Васильевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник НИЛ инженерной энзимологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: nvkalacheva@yandex.ru

Губская Валентина Петровна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, г. Казань.

E-mail: Gubskaya@iopc.kcn.ru

Мионов Владислав Алексеевич – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: kazan.vlad@gmail.com

Ильинская Ольга Николаевна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Olga.Ilinskaya@ksu.ru

Куриченко Борис Михайлович – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.