

Химия

УДК 577.322.72

К. Р. ГРИГОРЯН, А. А. ШИЛАДЖЯН

РОЛЬ ГИДРОФОБНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ ТЕПЛОВОЙ ДЕНАТУРАЦИИ СЫВОРОТОЧНЫХ АЛЬБУМИНОВ ЧЕЛОВЕКА И БЫКА В ПРИСУТСТВИИ ДИАЛКИЛСУЛЬФОКСИДОВ

Методом спектроскопии электронного поглощения в УФ-области исследовано влияние диалкилсульфоксидов (ДАСО) на термическую денатурацию сывороточных альбуминов человека и быка в температурном интервале 20–90⁰С. Выявлено, что в гомологическом ряду ДАСО гидрофобные взаимодействия с белком становятся более эффективными. Однако с удлинением углеводородной цепи, начиная с дипропилсульфоксида, вследствие заторможенной диффузии сульфоксидов денатурация белков наблюдается при более высоких температурах.

Введение. Гидрофобные эффекты играют важную роль в биологических системах. В частности гидрофобные взаимодействия являются одним из главных факторов, контролирующих создание и поддержание необходимой конформации природных макромолекул, а также их взаимодействие с другими молекулами, и, таким образом, способствуют поддержанию их нормальной биологической активности [1]. Сложность биологических систем приводит к необходимости изучения подобных эффектов в более простых модельных системах. В качестве одной из таких можно рассматривать раствор белка. В нативном белке доминирующими являются не ковалентные сегмент-сегментные взаимодействия, а взаимодействия аминокислотных остатков с молекулами окружающего растворителя. Из этих двух ответственными за разворачивание белка являются взаимодействия с растворителем, так как они модулируются свойствами и составом растворителя. За денатурацию белка ответственны гидрофобные взаимодействия. Эти же взаимодействия стабилизируют денатурированную форму белка [2]. Исследование денатурации белков в водно-органических растворителях может пролить свет на многие аспекты гидрофобных взаимодействий.

Нами исследована термическая денатурация сывороточных альбуминов человека (САЧ) и быка (БСА) в водно-диалкилсульфоксидных растворителях. Выбор этой системы обусловлен не только функциональной важностью этой биомолекулы, а также повышенным в последнее время вниманием исследователей к диалкилсульфоксидам (ДАСО) из-за их уникальных биологических свойств [3–5].

Влияние ДАСО на тепловую денатурацию альбуминов исследовали методом электронной спектроскопии в УФ-области в температурном интервале 20–90⁰С. В этих условиях термическое «разворачивание» альбумина описывается многоступенчатым механизмом по аппроксимационной модели Эйринга и Ламри, согласно которой денатурация альбумина протекает в две стадии – обратимую и необратимую [6].

Материалы и методы. В работе использовали САЧ (с содержанием жирных кислот менее 0,005%), БСА и диметилсульфоксид (ДМСО) фирмы «Sigma» (США), раствор хлорида натрия фирмы «Ликвор» (Армения). Дипропилсульфоксид (ДПСО) и дибутилсульфоксид (ДБСО) были синтезированы и очищены согласно [7]. Во всех экспериментах для приготовления растворов белка использовали бинарную смесь раствора хлорида натрия и ДАСО. Концентрация белков составляла 0,4 мг/мл. Концентрацию белков в растворе определяли с помощью УФ-спектроскопии при $\lambda = 280$ нм. Значения молярных коэффициентов поглощения принимали равными 36 500 М⁻¹·см⁻¹ для САЧ и 39 080 М⁻¹·см⁻¹ для БСА [8]. Концентрацию ДАСО варьировали от 0,5 до 20%.

УФ-спектрометрические измерения проводили с помощью спектрометра Spесord 50РС (Германия). Скорость сканирования температуры составляла 1⁰С/мин. Кривые плавления нормировали (от 0 до 1) с помощью компьютерной программы ORIGIN 7.5.

Результаты и обсуждение. САЧ и БСА являются глобулярными белками и состоят из одной полипептидной цепи, содержащей 585 и 583 аминокислотных остатка соответственно. Макромолекула состоит из трех гомологичных доменов. В этих белках имеется одна свободная меркапто-группа, которая может участвовать в образовании дисульфидов, что и лежит в основе пускового механизма денатурации этого белка. Аминокислотная последовательность и структура доменов сходны. Поверхность альбуминов характеризуется почти равным количеством гидрофильных и гидрофобных групп в контакте с водным растворителем. Выявлено, что все три домена альбумина подвергаются денатурации независимо друг от друга [9].

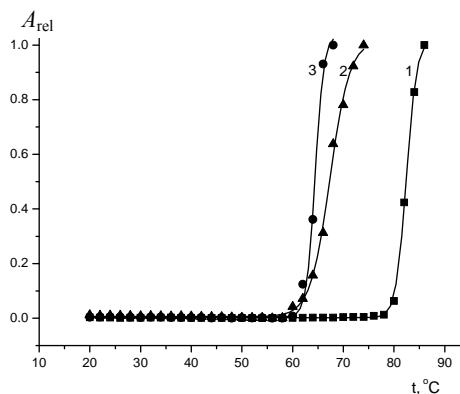
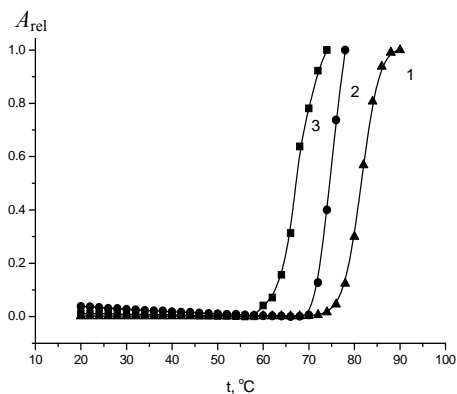


Рис. 1. УФ-профили термической денатурации чистого БСА (0,4 мг/мл, кр. 1) и БСА в присутствии ДПСО (0,5%, кр. 2 и 2%, кр. 3).

Рис. 2. Сравнительные кривые тепловой денатурации чистого БСА (0,4 мг/мл, кр.1) и БСА в присутствии ДПСО (2%, кр. 2), ДМСО (20%, кр. 3).

На рис. 1 приведены УФ-профили термической денатурации БСА в присутствии ДПСО. Как видно из рисунка, с повышением концентрации ДПСО кривые плавления перемещаются в сторону низких температур и характеризуются одним кооперативным переходом, что нетипично для таких белков. Как было показано авторами [10], денатурация альбумина характеризуется двухступенчатым переходом в присутствии ДМСО и трехступенчатым переходом в присутствии диэтилсульфоксида (ДЭСО). Сравнительно сильный и быстрый характер гидрофобных взаимодействий может привести к формированию «расплавленной глобулы» [11], что и наблюдается в присутствии ДЭСО. Однако в случае ДПСО гидрофобные взаимодействия настолько усиливаются, что эти переходы не наблюдаются. Интересным является тот факт, что денатурирующий эффект ДПСО проявляется при более низких концентрациях по сравнению с ДМСО (рис. 2). Логично было бы ожидать, что в гомологическом ряду ДАСО удлинение углеводородной цепи хотя бы на одну CH_2 -группу приведет к более интенсивному разворачиванию белка, подвергая белок гидрофобному коллапсу, вследствие чего с кривой денатурации исчезнет кооперативный переход (S-образная форма). Однако этого не наблюдается.

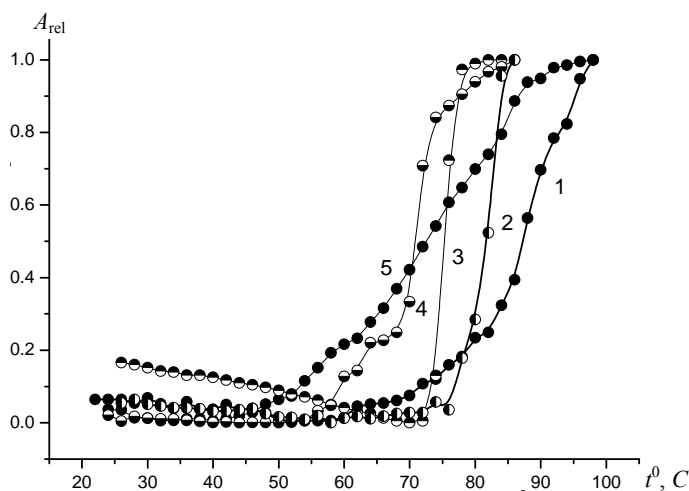


Рис. 3. УФ-профили термической денатурации чистого САЧ (0,4 мг/мл, кр. 1) и САЧ в присутствии ДБСО (0,5%, кр. 2), ДПСО (2%, кр. 3), ДМСО (20%, кр. 4), ДЭСО (2%, кр. 5).

На рис. 3 представлены УФ-профили термической денатурации САЧ в присутствии различных ДАСО. В присутствии ДПСО и ДБСО эти зависимости характеризуются не только кооперативным переходом, но и перемещением в сторону более высоких температур. Это свидетельствует о сравнительно высокой термостабильности белка. Такое поведение можно объяснить тем, что с удлинением углеводородной цепи, начиная с ДПСО, затормаживается диффузия молекул сульфоксидов через каналы, образованные растворителем в структуре белка. Вследствие этого денатурация белков наблюдается при более высоких температурах.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Кесслер Ю.М., Зайцев А.Л.** Сольвофобные эффекты. Теория, эксперимент, практика. Л.: Химия, 1989.
2. **Dill K., Alonso D., Hutchinson K.** Biochemistry, 1989, v. 28, p. 5439–5449.
3. **Bonora S., Markarian S., Trincherо A., Grigorian K.** Thermochem. Acta, 2005, v. 433, p. 19–26.
4. **Zhi-Wu Yu and Quinn P.** Bioscience Rep., 1994, v. 14, № 6, p. 259–280.
5. **Григорян К.** Мед. наука Арм., 2008, т. 48, №2, с. 67–72.
6. **Pico G.** Inter. J. Biol. Macromol., 1997, v. 20, p. 63–73.
7. **Маркарян Ш., Тадевосян Н.** Способ очистки диэтилсульфоксида. Пат. Республики Армения, 2002, № 20010041.
8. **Singh A. and Darshi M.** New J. Chem., 2004, v. 28, p. 120–126.
9. **Farruggia B., Rodriguez B., Rigatuso R., Fidelio G., Pico G.** J. Protein Chem., 2001, v. 20, № 1, p. 81–89.
10. **Григорян К., Маркарян Ш., Азнаурян М.** Вопросы криобиологии, 2009, №1, с. 3–9.
11. **Muzammil S., Kumar Y., Tayyab S.** Eur. J. Biochem., 1999, v. 266, p. 26–32.

Կ. Ռ. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ, Ա. Ա. ՇԻԼԱՋՅԱՆ

ՀԻԳՐՈՖՈԲ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԴԵՐԸ ՄԱՐԴՈՒ ԵՎ ՑՈՒԼԻ ՇԻՃՈՒԿԱՅԻՆ ԱԼԲՈՒՄԻՆՆԵՐԻ ՋԵՐՄԱՅԻՆ ԴԵՆԱՏՈՒՐԱՑԻԱՅԻ ԺԱՍԱՆԱԿ ԳԻԱԼԿԻԼՍՈՒԼՖՕՔՍԻԴՆԵՐԻ ՆԵՐԿԱՅՈՒԹՅԱՄԲ

Ամփոփում

Ուլտրամանուշակագույն մարզում էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիայի օգնությամբ ուսումնասիրված է դիալկիլսուլֆօքսիդների (ԴԱՍՕ) ազդեցությունը մարդու և ցուլի շիճուկային արբումինների ջերմային դենատուրացիայի վրա 20–90⁰C ջերմաստիճանային տիրույթում: Պարզված է, որ ԴԱՍՕ-ի հոմոլոգիական շարքում հիդրոֆոր փոխազդեցությունները սպիտակուցների հետ դառնում են ավելի արդյունավետ: Սակայն ածխաջրածնային շղթայի երկարացմանը զուգընթաց՝ սկսած դիպրոպիլսուլֆօքսիդից, սուլֆօքսիդների մոլեկուլների արգելակված դիֆուզիայի հետևանքով սպիտակուցների դենատուրացիան դիտվում է ավելի բարձր ջերմաստիճաններում:

K. R. GRIGORYAN, A. A. SHILAJYAN

ROLE OF HYDROPHOBIC INTERACTIONS AT THE THERMAL DENATURATION OF HUMAN AND BOVINE SERUM ALBUMINS AT THE PRESENCE OF DIALKYL SULFOXIDES

Summary

The effect of dialkylsulfoxides (DASO) on the thermal denaturation of serum albumins human and bovine in the temperature range 20–90⁰C has been investigated by the UV/vis absorption spectroscopy method. It has been shown that in the homologous series of DASO hydrophobic interactions with proteins become more effective. However, with the elongation of hydrocarbon chain, starting from dipropylsulfoxide, in consequence of breaking the diffusion of sulfoxide molecules, denaturation of proteins is observed at higher temperatures.