

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЫЧЬЕЙ КАРБОАНГИДРАЗЫ II
С ГУАНИДИНГИДРОХЛОРИДОМ: АГРЕГИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ДЕНАТУРАНТА

ABSTRACT: The unfolding of bovine carbonic anhydrase II (BCA II) induced by urea and guanidine hydrochloride (GdnHCl) at different pH was investigated. The results show that the transition into the "molten globule" state in the presence of GdnHCl in contrast to the urea-induced denaturation of the protein is accompanied by the increase of intensity of ANS fluorescence. It is explained by association of molecules of the protein in the presence of GdnHCl and incorporation of the ANS molecules between the associated BCA II molecules. This is confirmed by the fact, that in acidic pH, when the number of the negatively charged groups on the protein surface reduces, the increase of intensity of ANS fluorescence and fluorescence anisotropy takes place in lower concentration of GdnHCl.

Общепринятым подходом исследования фолдинга белков *in vitro* является изучение процессов их сворачивания–разворачивания под действием различных денатурирующих агентов. Наиболее часто используемыми химическими денатурантами являются мочевины и гуанидингидрохлорид (GdnHCl). При использовании в качестве денатуранта GdnHCl необходимо учитывать некоторые особенности его взаимодействия с белками: при небольших концентрациях денатурант может оказывать на белки стабилизирующее действие за счет снятия существующего напряжения в белке, обусловленного электростатическим взаимодействием заряженных групп на его поверхности. На примере инактивированного актина ранее было показано, что данный денатурант может оказывать на белки также агрегирующее действие.

Цель работы состояла в проверке того, насколько общим является этот эффект.

В качестве объекта исследования была выбрана карбоангидраза II – цинкосодержащий фермент, катализирующий обратимую реакцию гидратации диоксида углерода. Денатурация бычьей карбоангидразы II под действием мочевины и гуанидингидрохлорида проходит через образование промежуточного состояния типа расплавленной глобулы. При этом в случае денатурации белка GdnHCl, наблюдается возрастание анизотропии флуоресценции, что является довольно странным, поскольку принято считать, что в этом состоянии происходит увеличение подвижности боковых цепей аминокислотных остатков по сравнению с нативным состоянием.

Мы предположили, что обнаруженный эффект обусловлен ассоциацией макромолекул карбоангидразы после ее перехода в состояние расплавленной глобулы за счет нейтрализации отрицательного поверхностного заряда макромолекулы белка ионами гуанидина.

В работе были зарегистрированы равновесные зависимости характеристик собственной флуоресценции белка и флуоресценции АНС от концентрации гуанидингидрохлорида и мочевины при разных значениях pH раствора. Уменьшение pH раствора в случае денатурации белка GdnHCl приводит к тому, что максимальные значения анизотропии флуоресценции и интенсивности флуоресценции АНС достигаются при меньших концентрациях денатуранта. Данный эффект объясняется тем, что при уменьшении pH раствора уменьшается количество отрицательных зарядов на поверхности белка и, следовательно, количество катионов гуанидина, необходимое для их нейтрализации, тоже становится меньше.

Таким образом, условия для агрегации макромолекул карбоангидразы появляются при меньших концентрациях денатуранта. При денатурации мочевиной макромолекулы карбоангидразы II остаются заряженными отрицательно, что препятствует агрегации белка в

состоянии расплавленной глобулы. Поэтому при денатурации карбоангидразы II под действием мочевины не наблюдается увеличения интенсивности флуоресценции АНС и роста анизотропии флуоресценции.

Переход карбоангидразы II в промежуточное состояние типа расплавленной глобулы в процессе разворачивания фермента под действием GdnHCl сопровождается агрегацией белка, проявляющейся в возрастании анизотропии собственной флуоресценции и интенсивности флуоресценции АНС. Агрегирующее действие GdnHCl необходимо учитывать в работах по изучению фолдинга белков при использовании GdnHCl в качестве денатурирующего агента.