

## ŠTÚDIUM MOLTEN GLOBULÁRNEHO STAVU CYTOCHRÓMU C POMOCOU VISKOZIMETRIE

MAREK STUPÁK<sup>a</sup> a MARIÁN ANTALÍK<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF a LABMED, a.s., Tr. SNP 1, 040 11 Košice, <sup>b</sup> Katedra biochémie UPJŠ PF, Šrobárova 2, 041 54 Košice, <sup>c</sup> Oddelenie biofyziky ÚEF SAV, Watsonova 47, 040 01 Košice  
marek.stupak@upjs.sk

Došlo 15.7.13, prijaté 20.9.13.

Kľúčové slová: molten globulárny, cytochróm c, viskozimeter

### Úvod

Štruktúrne vlastnosti molten globulárneho (MG) stavu rôznych proteínov sú veľmi dobre preštudované<sup>1</sup>. V tomto stave, ktorý je podobný natívnemu stavu, sú  $\alpha$ -závitnice aj  $\beta$ -listy viac alebo menej fixované vo svojich približne natívných pozíciách. Molekula proteínu v tomto stave nemá žiadnu (alebo obsahuje len nepatrné stopy) terciárnu štruktúru<sup>2</sup>. V zásade sa rozlišujú dva typy MG stavu: rovnovážny a kinetický. Vlastnosti MG stavu boli študované najmä u rovnovážneho MG stavu a na základe značného množstva experimentálnych aj teoretických výsledkov je MG stav považovaný za samostatný termodynamický stav<sup>3</sup>. Kinetický MG stav je pravdepodobne prítomný pri procese zbaľovania, resp. rozbaľovania proteínov. Ukazuje sa však, že štruktúrne vlastnosti kinetického MG stavu sú iné pri zbaľovaní a iné pri rozbaľovaní proteínu<sup>4</sup>. Na základe toho sa v poslednej dobe rozlišuje tzv. suchý MG stav (dry MG), ktorý sa pozoruje pri procese zbaľovania proteínov a tzv. mokrý (wet MG), ktorý sa objavuje pri rozbaľovaní proteínov<sup>5</sup>.

V tejto práci je na štúdium MG stavu cytochrómu c (cyt c) použitá predovšetkým technika viskozimetrie. Využili sme pritom nový, citlivý viskozimeter VISCODENS, ktorý bol vyvinutý na pracovisku ÚEF SAV v Košiciach<sup>6</sup>. Tento viskozimeter umožňuje získavanie veľmi presných viskozimetrických dát, ktoré dokážu citlivo reagovať na konformačné zmeny proteínov. Zároveň sme sa v tejto práci pokúsili o porovnanie viskozimetrických meraní s výsledkami získanými metódou kruhového dichroizmu pri štúdiu konformačných zmien cyt c.

### Materiál a metódy

#### Viskozimetria

Viskozimetrické merania boli uskutočnené pomocou plavákového viskozimetra VISCODENS<sup>6</sup>. Je to rotačný viskozimeter, v ktorom je v meranej vzorke ponorený sklenený plavák udržiavaný vo vertikálnej polohe v elektromagnetickom poli. Vo vnútri plaváku sú dva kovové valčeky, jeden v hornej a druhý v spodnej časti plaváku. V jednom z nich je v hornej časti upevnený permanentný magnet, ktorý je v interakcii s magnetickým poľom cievky a udržuje plavák v rovnováhe v zvislom smere. To umožňuje priamo merať hustotu vzorky.

Kovový valček v spodnej časti plaváku je umiestnený v magnetickom poli dvoch permanentných magnetov, ktoré sa otáčajú uhlovou rýchlosťou  $\omega_m$ . Ich magnetické pole indukuje vírivé prúdy v kovovom valčeku a to spôsobuje roztočenie plaváku s uhlovou rýchlosťou  $\omega_b$ . Zistené hodnoty  $\omega_m$  a  $\omega_b$  slúžia na výpočet viskozity. Merania viskozity uskutočňuje prístroj pri konštantnej šmykovej rýchlosti.

Roztok cyt c bol pred každým meraním čerstvo pripravený, pričom použitá koncentrácia bola  $242 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Pri každom meraní bola zmeraná aj základná krivka bez prítomnosti proteínu, ktorú predstavoval  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  fosfátový tlmivý roztok, ktorý bol použitý ako referenčné rozpúšťadlo v analýze. Rýchlosť ohrevu bola  $20 \text{ }^\circ\text{C h}^{-1}$ . Šmyková rýchlosť bola  $\gamma = 60 \text{ s}^{-1}$ , objem vzoriek  $1,6 \text{ ml}$ . Merania boli uskutočnené v rozsahu  $20\text{--}80 \text{ }^\circ\text{C}$  pri pH 2,0.

#### Kruhový dichroizmus

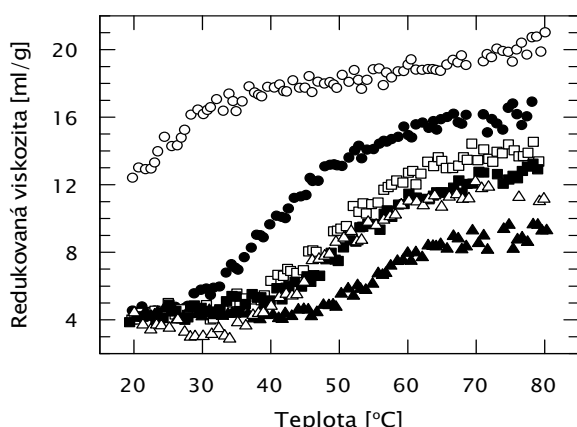
Merania kruhového dichroizmu cyt c boli vykonané na spektropolarimetri Jasco J-810. Experimenty boli uskutočnené v  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  fosfátovom pufrí s koncentráciou proteínu  $6,1 \mu\text{mol l}^{-1}$  pri pH 2,0 v  $0,1 \text{ cm}$  kyvete. Každé spektrum vzniklo akumuláciou 10 postupných skenov. Konformačné prechody v cyt c indukované teplotou boli monitorované pri 222 nm. Rýchlosť ohrevu bola konštantná  $1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ . Teplota vzorky bola kontrolovaná Peltierovým článkom PTC-348 WI.

### Výsledky

#### Viskozimetrické merania

Viskozimetrické merania cyt c boli uskutočnené v prítomnosti rozličných koncentrácií NaCl pri pH 2 (obr. 1). Molekula proteínu je v neprítomnosti soli rozbalená, hodnota redukovanej viskozity pri  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  je rovná  $15,2 \text{ ml g}^{-1}$ , s rastom teploty mierne narastá a pri  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  viskozita dosahuje hodnotu  $20 \text{ ml g}^{-1}$ .

Po zvýšení iónovej sily pridaním  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  NaCl k rozbalenému cyt c pri  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  dochádza k poklesu redukovanej viskozity na  $4,8 \text{ ml g}^{-1}$ , čo znamená obnovenie kompaktnosti štruktúry cyt c. V týchto podmienkach sa proteín



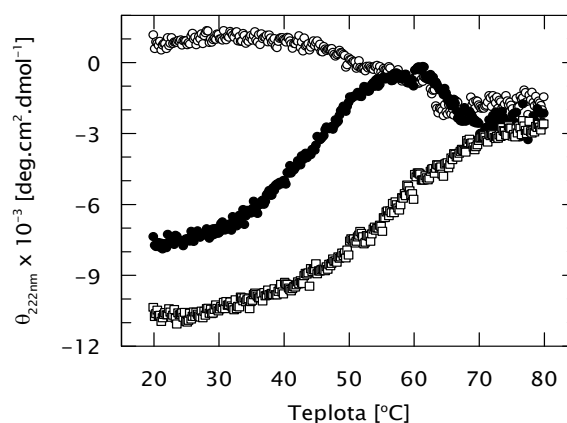
Obr. 1. Závislosť redukovanej viskozity cyt *c* v prítomnosti NaCl. Použitie koncentrácie NaCl: (○) 0; (●) 0,1; (□) 0,2; (■) 0,3; (Δ) 0,4 a (▲) 0,5 mol l<sup>-1</sup>

nachádza v MG stave. So zvyšovaním koncentrácie NaCl sa táto hodnota redukovanej viskozity výraznejšie nemení a pohybuje sa v rozmedzí 4–4,8 ml g<sup>-1</sup>. So stúpajúcou teplotou je možné pozorovať v prítomnosti soli teplotné prechody s nízkou kooperatívnosťou. Zároveň je zrejme, že so zvyšovaním koncentrácie NaCl rastie teplota prechodu  $T_m$ .

Zaujímavý jav je možné pozorovať pri teplote 80 °C pre všetky použité koncentrácie soli. Ako ukazuje obr. 1, globálna štruktúra proteínu je pre každú danú koncentráciu NaCl pri tejto teplote iná, čo dokumentuje hodnota redukovanej viskozity. Zatiaľ čo v prípade nulovej koncentrácie soli je hodnota redukovanej viskozity 20 ml g<sup>-1</sup>, v prítomnosti 0,1 molárnej soli sa znižuje na 16,5 ml g<sup>-1</sup> a so zvyšovaním koncentrácie ďalej klesá. V prípade 0,5 mol l<sup>-1</sup> NaCl táto veličina dosahuje hodnotu 9 ml g<sup>-1</sup>. Na základe týchto údajov je možné uvažovať o neúplnom rozbalení štruktúry cyt *c* vplyvom teploty pri vysokej iónovej sile rozpúšťadla.

#### Merania metódou cirkulárneho dichroizmu

Na obr. 2 je prezentovaný teplotný prechod cyt *c* v kyslej oblasti (pH 2) sledovaný pri 222 nm v prítomnosti rozličnej koncentrácie soli. Hodnota elipticity v roztoku cyt *c* bez prítomnosti NaCl potvrdzuje rozbalený stav tohto proteínu v rozmedzí 20–80 °C v daných experimentálnych podmienkach<sup>7,8</sup>. Po zvýšení iónovej sily roztoku na 0,2 mol l<sup>-1</sup> NaCl klesá hodnota molárnej elipticity cyt *c* pri 20 °C, čo znamená čiastočné obnovenie sekundárnej štruktúry proteínu v prítomnosti soli. V prítomnosti 0,5 mol l<sup>-1</sup> NaCl pozorujeme negatívnejšiu hodnotu elipticity pri 20 °C, čo predstavuje výraznejšie zastúpenie sekundárnej štruktúry a cyt *c* sa nachádza v MG stave<sup>9,10</sup>. S rastom teploty pozorujeme konformačné prechody s rozličnou kooperatívnosťou. Pri 80 °C dosiahne hodnota elipticity v roztoku s 0,5 mol l<sup>-1</sup> NaCl hodnotu elipticity v roztoku bez soli.



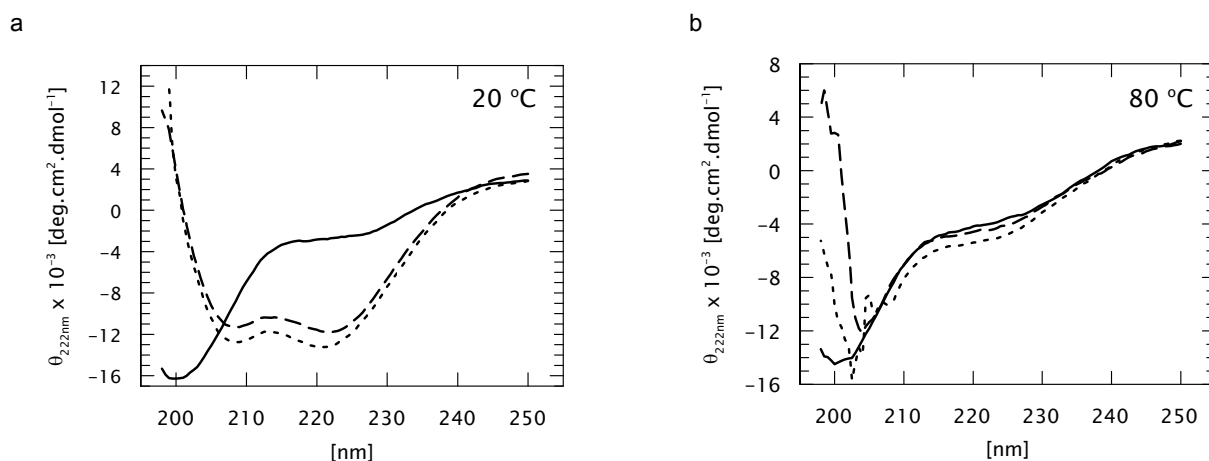
Obr. 2. Teplotný prechod cyt *c* v pH 2 pri 222 nm. Koncentrácie prítomného NaCl: (○) 0, (●) 0,2 a (□) 0,5 mol l<sup>-1</sup>

CD spektrá cyt *c* v ďalekej UV oblasti sú znázornené na obr. 3a,b. Cyt *c* v roztoku s nízkou iónovou silou má pri 20 °C aj pri 80 °C spektrum charakteristické pre rozbalený stav proteínu. So zvyšovaním iónovej sily je možné pri 20 °C pozorovať spektrá MG stavu (obr. 3a)<sup>11</sup>. Naproti tomu pri 80 °C sú všetky spektrá takmer identické, dokumentujúce rozbalený stav molekuly proteínu (obr. 3b).

#### Diskusia

Pri štúdiu MG stavu cyt *c* sme použili dve metódy: *i*) kruhový dichroizmus, ktorým je možné z meraní v ďalekej UV oblasti zistiť množstvo helikálnych štruktúr a teda mieru sekundárnej štruktúry a *ii*) viskozimetriu, prostredníctvom ktorej na základe meranej viskozity usudzujeme o priestorovom rozložení proteínu (obr. 1–3). Táto technika bola v ostatných rokoch v relatívnom pozadí záujmu. Avšak celkom nedávno sa najmä použitím nového, vysoko citlivého viskozimetra, ktorý bol vyvinutý na pracovisku ÚEF SAV v Košiciach, podarilo odhaliť prítomnosť reziduálnych štruktúr v teplotne denaturovanej glukóza-oxidáze<sup>12</sup>, ako aj charakterizovať konformačné zmeny NADH oxidázy<sup>13</sup>.

Mnoho bázických proteínov, medzi nimi aj cyt *c*, je v prostredí s pH 2 bez prítomnosti solí výrazne rozbalených, avšak pridaním aniónov soli alebo kyseliny vedie k stabilizácii kompaktného MG stavu týchto proteínov. Mechanizmus soľami indukovaného konformačného prechodu navrhol Goto a spol.<sup>9</sup>. Anióny môžu interagovať s kladnými nábojmi rozbaleného ako aj MG stavu proteínu. Soľami indukovaný vznik MG stavu je možné vysvetliť v zmysle preferenčného viazania sa aniónov do kompaktného zbaleného MG stavu v porovnaní s väzbou do expandovaného rozbaleného stavu. V prostredí s pH 2 sú všetky ionizovateľné skupiny protonizované a teda sieť nábojov MG stavu je v podstate tá istá ako v prípade roz-



Obr. 3. CD spektrá cyt *c* v ďalekej UV oblasti pri 20 °C (a), resp. 80 °C (b); — 0 mol l<sup>-1</sup> NaCl, --- 0,2 mol l<sup>-1</sup> NaCl, - - - 0,5 mol l<sup>-1</sup> NaCl

baleného stavu pri tom istom pH. Nakoľko viazanie aniónov má charakter elektrostatických interakcií, kompaktný MG stav s vyššou nábojovou hustotou viaže anióny oveľa pevnejšie ako rozbalený stav. Výsledkom je zvyšovanie stability MG stavu s rastúcou koncentráciou soli. So zvyšovaním teploty dochádza k rozbaľovaniu proteínu z MG stavu do stavu rozbaleného pozorovaného pri vysokých teplotách (>70 °C).

Uvedené skutočnosti potvrdzujú aj naše merania (obr. 2). Molekula cyt *c* v prostredí s nízkou iónovou silou je pri 20 °C rozbalená, zvyšovaním koncentrácie soli pozorujeme obnovenie sekundárnej štruktúry, v roztoku 0,2 mol l<sup>-1</sup> NaCl neúplné (obr. 3a) a v prípade 0,5 mol l<sup>-1</sup> soli takmer úplné v porovnaní s natívnym stavom<sup>11</sup>. S rastúcou teplotou sa CD signál cyt *c* pri 222 nm v prítomnosti vysokej iónovej sily stráca, CD spektrum v ďalekej UV oblasti sa prekrýva so spektrom získaným pri nízkej iónovej sile a potvrdzuje sa tak rozbalený stav molekuly proteínu (obr. 3b).

Zaujímavé výsledky nám poskytlo sledovanie cyt *c* vo vyššie spomenutých podmienkach pomocou viskozimetrie. Pridaním soli k úplne rozbalenému proteínu pozorujeme zníženie redukovanej viskozity, hydrodynamický objem molekuly sa znižuje, čo naznačuje, že proteín sa nachádza v MG stave (obr. 1). Vplyvom teploty proteín zväčšuje svoje rozmery, kladie zvýšený odpor obtekaniu rozpúšťad-

lom a rozbaľuje sa. Zvyšujúca sa koncentrácia soli spôsobuje zvýšenie teploty prechodu. Prekvapivým faktom je zistenie, že sa proteín s rastom teploty nerozbaľuje úplne. Zvyšujúca sa koncentrácia soli spôsobuje dokonca pokles redukovanej viskozity cyt *c* pri vysokej teplote (obr. 1). Celková veľkosť molekuly proteínu je tak pri 80 °C oproti nízkej iónovej sile takmer o dve tretiny menšia. Z termodynamického hľadiska je prípustná existencia MG stavu aj pri vysokých teplotách<sup>14</sup>. Z našich meraní je však zrejmé, že cyt *c* pri vysokých teplotách nie je v MG stave (obr. 3b). Viskozimetrické merania tak s najväčšou pravdepodobnosťou odhaľujú nový stav cyt *c* pri vysokej iónovej sile a vysokých teplotách. Pre tento nový konformačný stav je príznačná absencia sekundárnej štruktúry, no globálna štruktúra je výrazne kompaktnejšia v porovnaní s úplne rozbaleným proteínom. Prítomnosť soli pri vysokých teplotách spôsobuje, že bočné reťazce aminokyselín ostávajú v určitých interakciách, ktoré zabraňujú rozbaľeniu molekuly proteínu. V tab. I sú uvedené termodynamické parametre popisujúce daný teplotný prechod cyt *c*. Výrazné rozdiely medzi pozorovanými zmenami entalpií a teplôt prechodu zistených pomocou viskozimetrie a CD spektroskopie by sa dali vysvetliť z troch hľadísk: *i*) rozbaľovanie proteínu s teplotou je v týchto podmienkach nekooperatívnym procesom, preto sú teploty prechodu rozdielne, *ii*) rozdielnymi podmienkami merania,

Tabuľka I

Termodynamické parametre rozbaľovania cyt *c* získané z viskozimetrie a CD spektroskopie

Koncentrácia NaCl [mol l <sup>-1</sup> ]	Viskozimetria		CD spektroskopie	
	$\Delta H_m$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	$T_m$ [°C]	$\Delta H_m$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	$T_m$ [°C]
0	–	–	–	–
0.2	133.7 ± 9.7	49.6 ± 0.3	116.4 ± 2.6	52.4 ± 0.4
0.5	220.2 ± 24.5	54.1 ± 0.4	93.5 ± 2.5	59.8 ± 0.8

najmä rôznou rýchlosťou ohrevu a použitými koncentraciami a *iii*) intermolekulovou interakciou, ktorej prítomnosť by sme predpokladali z meraní viskozity. Takáto interakcia by vo vysokých teplotách stabilizovala štruktúru proteínu. V tomto prípade by objavenie sa takejto intermolekulovej interakcie podporovalo myšlienku prítomnosti nového konformačného stavu cyt *c*.

## Záver

Pomocou viskozimetrie sme sledovali konformačné zmeny cyt *c*. Na základe viskozimetrických meraní sme navrhli existenciu pravdepodobne nového konformačného stavu cyt *c* v prostredí vysokej iónovej sily a vysokej teploty. Táto práca zároveň preukázala možnú aplikáciu nového vysoko citlivého viskozimetra, umožňujúceho uskutočniť experimenty s minimálnym množstvom vzorky a v relatívne krátkom čase. Takýto prístup by mohol v budúcnosti viesť k ďalším zaujímavým výsledkom v oblasti štúdia konformačných stavov proteínov v rôznych fyzikálno-chemických podmienkach.

## LITERATÚRA

1. Baldwin R. L., Frieden C., Rose G. D.: *Proteins* 78, 2725 (2010).
2. Uversky V. N., Dunker A. K.: *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 1231 (2010).
3. Uversky V. N., Ptitsyn O. B.: *Biochemistry* 33, 2782 (1994).
4. Qian H.: *Protein Sci.* 11, 1 (2002).
5. Bhattacharyya S., Varadarajan R.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23, 11 (2013).
6. Bánó M., Strhársky I., Hrmo I.: *Rev. Sci. Instrum.* 74, 4788 (2003).

7. Kuroda Y., Kidokoro S., Wada A.: *J. Mol. Biol.* 223, 1139 (1992).
8. Xu Q., Keiderling T. A.: *Protein Sci.* 13, 2949 (2004).
9. Goto Y., Takahashi N., Fink A. L.: *Biochemistry* 29, 3480 (1990).
10. Fink A. L., Calciano L. J., Goto Y., Kurotsu T., Paleros D. R.: *Biochemistry* 33, 12504 (1994).
11. Vassilenko K. S., Uversky V. N.: *Bioch. Biophys. Acta* 1594, 168 (2002).
12. Žoldák G., Zubřík A., Musatov A., Stupák M., Sedlák E.: *J. Biol. Chem.* 279, 47601 (2004).
13. Žoldák G., Musatov A., Stupák M., Sprinzl M., Sedlák E.: *Gen. Physiol. Biophys.* 24, 279 (2005).
14. Griko Y. V.: *J. Mol. Biol.* 297, 1259 (2000).

**M. Stupák<sup>a</sup>, M. Antalík<sup>b,c</sup>** (<sup>a</sup> *Department of Medicinal and Clinical Biochemistry and Labmed, Co., Faculty of Medicine, Košice*, <sup>b</sup> *Department of Biochemistry, Faculty of Natural Science, P. J. Šafárik University, Košice*, <sup>c</sup> *Department of Biophysics, Institute of Experimental Physics of Slovak Academy of Sciences, Košice*): **A Study of The Molten Globule State of Cytochrome *c* by Viscometry**

Combination of viscometry and CD spectrometry made it possible to suggest the existence of a new conformational state of cytochrome *c* at high temperatures and ionic strengths. The molten globule state of cytochrome *c* was found at acidic pH in the presence of high concentrations of a salt at 20 °C. A low-cooperative conformational change of the cytochrome *c* to the unfolded state was observed with increasing temperature. Viscometry is a suitable tool for studies of similar processes in biomacromolecules.