

Paweł A. Osmulski, Wirgiliusz Duda, Piotr Duchnowicz*

STABILNOŚĆ HEMOGLOBINY *CHIRONOMUS THUMMI THUMMI* W UKŁADZIE ROZPUSZCZALNIKÓW WODA-GLIKOL ETYLENOWY

Badanie mechanizmu denaturacji Hb CTT

Wykonano jakościową analizę wpływu glikolu etylenowego (EG) na trwałość natywnej struktury monomerycznych i dimerycznych methemoglobin izolowanych z larw *Chironomus thummi thummi* (CTT Hb) za pomocą pomiarów termodynamicznych denaturacji metodą równowagową. Wyniki badań denaturacji przeprowadzonej w różnych warunkach pH świadczą, że trwałość dimerycznych Hb CTT jest zbliżona do Hb A człowieka, natomiast składniki monomeryczne wykazują większą labilność. Przebieg zależności entalpii denaturacji od stężenia EG ma nieco odrębny charakter w przypadku składników monomerycznych i dimerycznych. Stwierdzono mianowicie dla Hb dimerycznych znaczny spadek energii denaturacji już w bardzo niskich stężeniach EG, co związane jest prawdopodobnie z zaburzeniem oddziaływań między łańcuchami tworzącymi dimer i w konsekwencji ich rozdysocjowaniem. Dalszy przebieg krzywych jest podobny dla obu kategorii Hb: obserwowany jest wzrost energii denaturacji osiągający maksimum przy ułamku molowym EG 0,04–0,05, a następnie szybki jej spadek. Otrzymane rezultaty umożliwiają przyjęcie następującej hipotezy. Stabilność strukturalna i dynamiczna białek globularnych jest kontrolowana przez oddziaływania z otaczającymi je cząsteczkami wody. Dodanie do środowiska rozpuszczalnika organicznego posiadającego równocześnie właściwości hydrofilowe i hydrofobowe, jakim jest EG zaburza natywną konformację białka poprzez zmianę charakterystycznej struktury otoczki hydratacyjnej. W określonych stężeniach EG powoduje przyjęcie przez białko konformacji supernatywnej, czego wyrazem są zmiany w przebiegu widm absorpcyjnych w zakresie UV świadczące o zaburzeniu otoczenia reszt hydrofobowych. Wyższe stężenia EG są wystarczające do utworzenia nowej otoczki wokół cząsteczki białka, powodującej inną jego organizację przestrzenną.

1. WSTĘP

Wiadomo, że właściwości biologiczne białek uwarunkowane są ich przestrzenną, specyficzną strukturą, która jest wynikiem ułożenia reszt aminokwasów w odpowiedniej sekwencji, ich wzajemnym oddziaływaniem, a także ich oddziaływaniami z cząsteczkami otaczającego rozpuszczalnika.

* Department of Physics, University of Illinois at Urbana, Urbana, Illinois USA.

Powszechnie przyjmowana jest koncepcja, wg której białka są kinetycznymi strukturami nierównowagowymi o subtelnych różnicach energii między przejściami konformacyjnymi. Ich obserwowana struktura jest więc pewnym labilnym stanem równowagi pomiędzy entropią konformacji a energią stabilizacji [3]. Podwyższenie hydrofobowości środowiska zmienia tę równowagę poprzez zaburzenie otoczki hydratacyjnej białka. Prowadzi to do rozerwania natywnych wiązań wodorowych i zastąpienia ich przez wiązania typu peptyd–cząsteczka wody lub peptyd–cząsteczka alkoholu oraz do ekspozycji hydrofobowego wnętrza maskowanego w stanie natywnym.

Ogólnie, alkohole wielowodorotlenowe, do których należy glikol etylenowy (EG), wzmagają wiązania hydrofobowe stabilizując w ten sposób natywną konformację białka. Efekt ten związany jest z faktem, że dodanie EG do wodnego roztworu białka powoduje wzrost jego potencjału chemicznego, co jest wynikiem dużej, dodatniej zmiany entalpii wystarczającej do kompensacji wzrostu entropii. Ten termodynamicznie nie faworyzowany stan prowadzi do zmniejszenia powierzchni kontaktu białko–rozpuszczalnik poprzez wzmoczenie wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań hydrofobowych i szczególnego rozmieszczenia cząsteczek rozpuszczalnika wokół grup niepolarnych [4].

Glikol etylenowy jest związkiem chemicznym powszechnie stosowanym w przemyśle i gospodarstwach domowych. Podawany *per os* wykazuje średnią toksyczność (dawka śmiertelna ok. 15–100 g). Wprowadzony do organizmu ulega przemianie do kwasu glikolowego, szczawiowego i mrówkowego, głównie przy udziale dehydrogenazy alkoholowej, co powoduje kwasicę metaboliczną związaną z akumulacją anionów organicznych [2]. Jednak brak jest dotychczas pełnego opracowania dróg jego przemian i eliminacji z organizmu. Nie jest też jasne czy związek ten *in vivo* jest w stanie powodować istotne zmiany struktury białek, podobne do tych obserwowanych *in vitro*, aczkolwiek stwierdzono methemoglobinemię w ostrych zatruciach EG [2]. Niedostateczny opis przedstawianych zjawisk oraz stwierdzona duża labilność hemoglobin izolowanych z larw *Chironomus thummi thummi* skłoniła autorów do przeprowadzenia badań nad stabilnością tych białek w układzie woda–EG.

2. MATERIAŁ I METODY

Hb *Chironomus thummi thummi* wyizolowano i rozdzielono na składniki monomeryczne (Hb CTT M) i dimeryczne (Hb CTT D) w sposób przedstawiony wcześniej [6]. Formę utlenioną tych białek otrzymano przez dodanie ok. dwukrotnego nadmiaru $K_3[Fe(CN)_6]$, który następnie usuwano za pomocą sączenia molekularnego na kolumnie ze złożem Sephadex G-25.

Stałe szybkości denaturacji metHb wyznaczono metodą spektrofotometryczną na podstawie pomiarów zmian absorbancji w paśmie Soreta ($\lambda = 405 \text{ nm}$). Założono, że denaturacja tego białka jest reakcją I rzędu, wobec czego skorzystano z równania Arrheniusa w celu obliczenia parametrów termodynamicznych badanego procesu:

$$\ln k_T = \ln \frac{kT}{h} + \frac{\Delta S_a}{R} + \frac{\Delta E_a}{RT},$$

gdzie: k_T – stała szybkość reakcji w temperaturze T ,
 k – stała Boltzmana ($1,308 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$),
 h – stała Plancka ($6,626 \times 10^{-34} \text{ J s}$),
 R – stała gazowa ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$),
 ΔS_a – entropia aktywacji,
 ΔE_a – energia (entalpia) aktywacji.

Energię swobodną aktywacji ΔF_a obliczono wg następującej zależności:

$$\Delta F_a = \Delta E_a - T\Delta S_a,$$

a zawartość niezdenaturowanej methemoglobiny na podstawie wzoru:

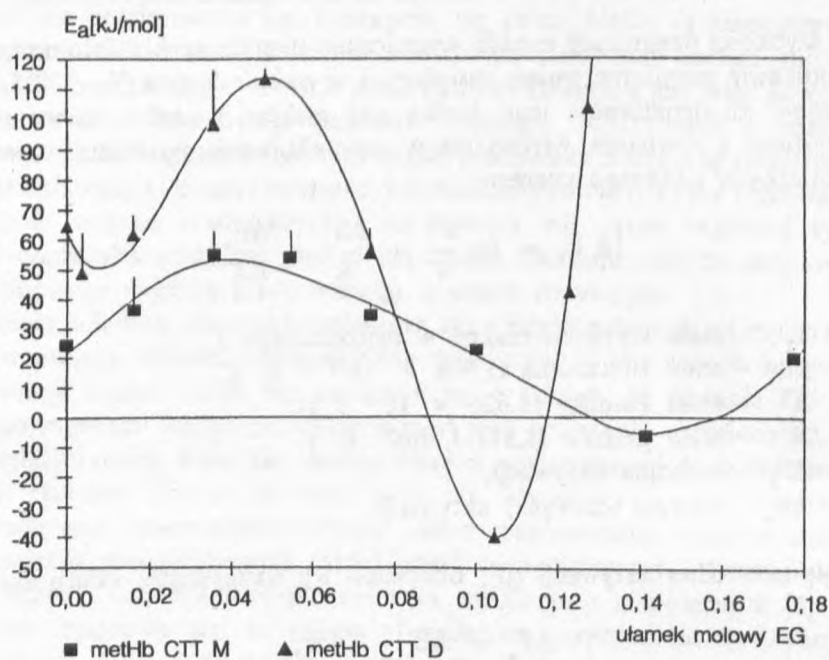
$$\text{Hb}_N = \frac{A_t - A_\infty}{A_0 - A_\infty}$$

gdzie: A_t – absorpcja roztworu metHb w czasie t ,
 A_0 – absorpcja roztworu metHb w $t = 0$,
 A_∞ – absorpcja roztworu metHb po 24 godz. inkubacji.

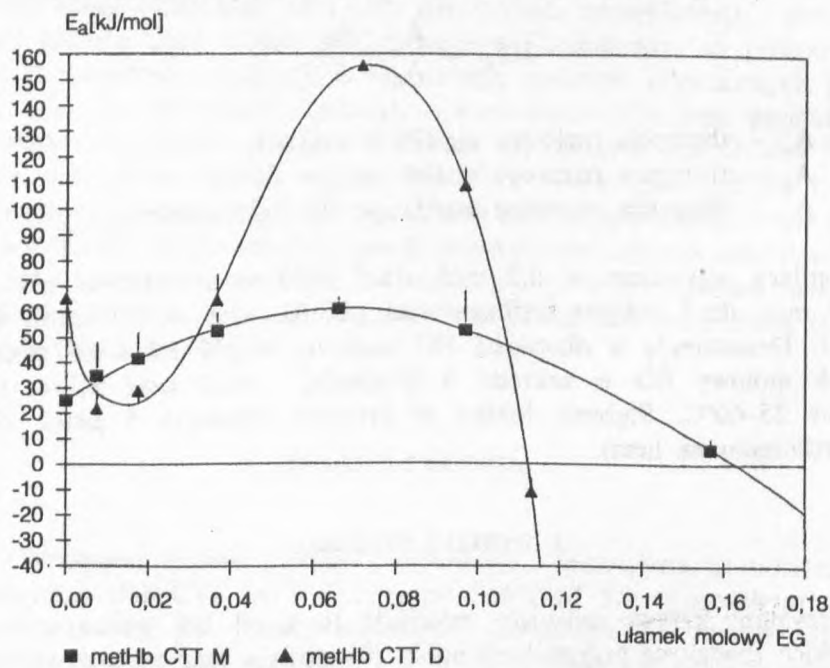
Pomiary wykonano w $0,2 \text{ mol. dm}^{-3}$ buforze octanowym pH 3,8, w $0,2 \text{ mol. dm}^{-3}$ buforze fosforanowym pH 6,0 oraz w $0,05 \text{ mol. dm}^{-3}$ NaOH. Denaturację w obecności EG zbadano w pH 3,8 i 6,0 stosując ułamek molowy EG w zakresie 0 (kontrola) – 0,25 oraz zakres temperatur $25\text{--}60^\circ\text{C}$. Stężenie białka w próbach wynosiło $5 \mu\text{mol. dm}^{-3}$ (w przeliczeniu na hem).

3. WYNIKI I DYSKUSJA

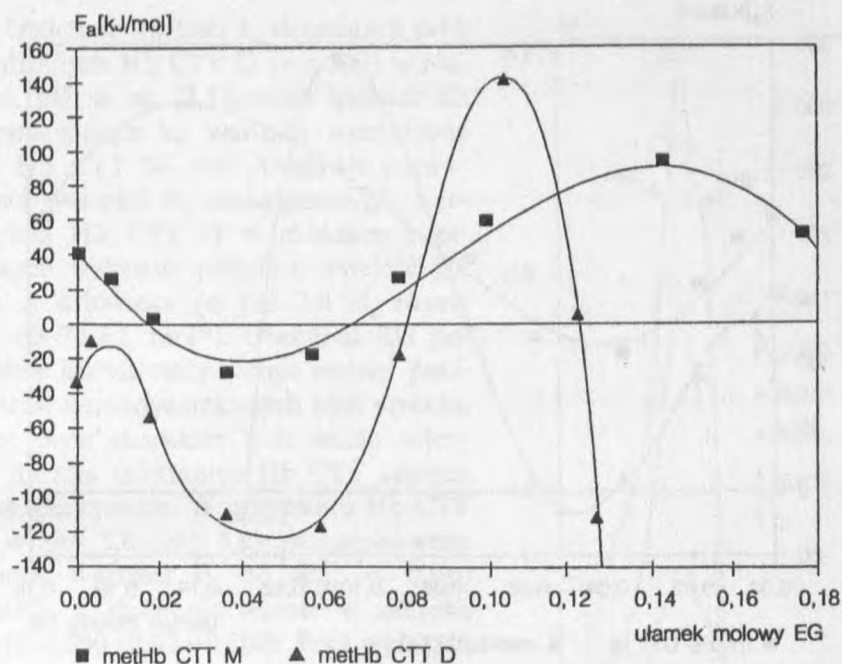
Otrzymane krzywe opisujące zależność $\ln k$ od $1/T$ wykazywały we wszystkich zbadanych przypadkach punkt przegięcia w temperaturze $45\text{--}50^\circ\text{C}$, w związku z czym dalszą analizę prowadzono tylko w zakresie temperatur $25\text{--}40^\circ\text{C}$.



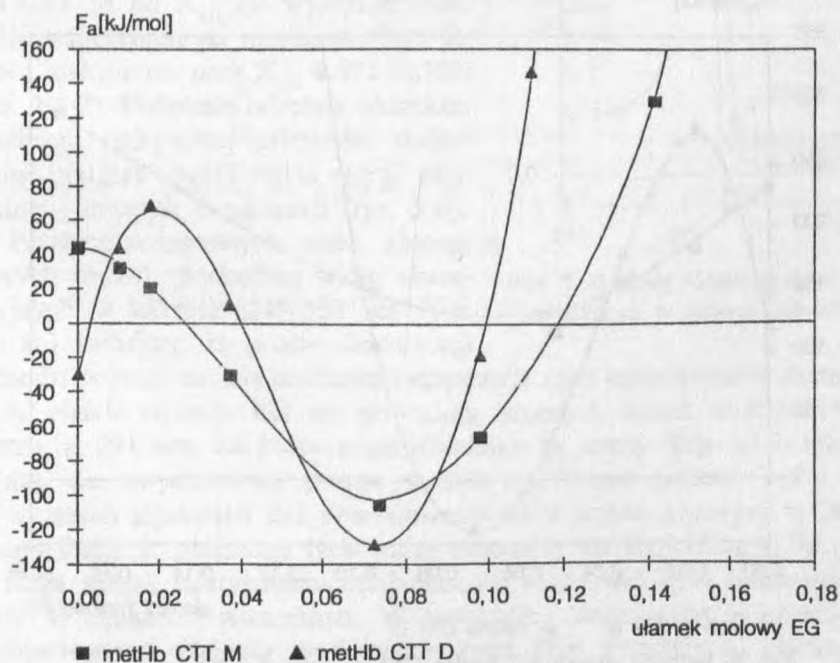
Rys. 1. Energia denaturacji methHb CTT w obecności EG w pH 3,8



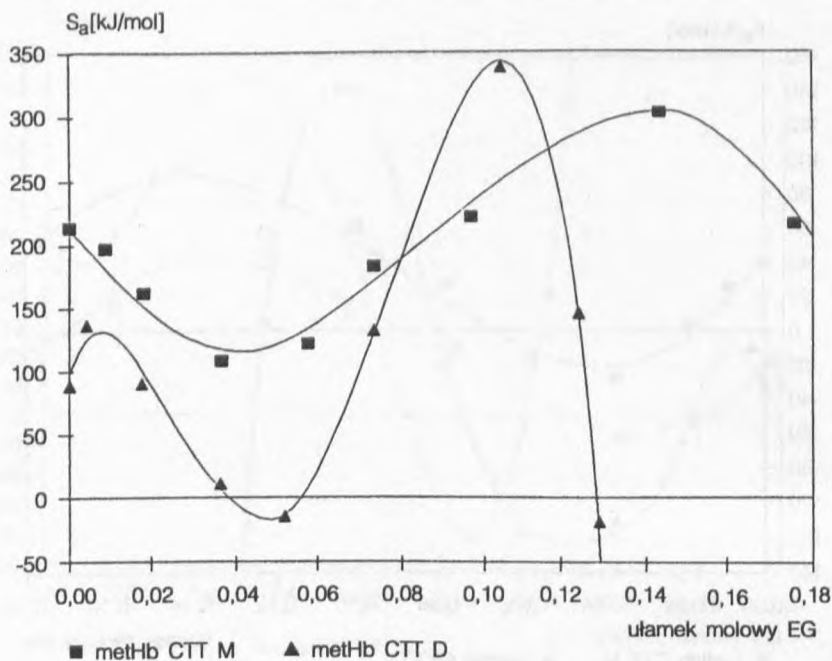
Rys. 2. Energia denaturacji methHb CTT w obecności EG w pH 6,0



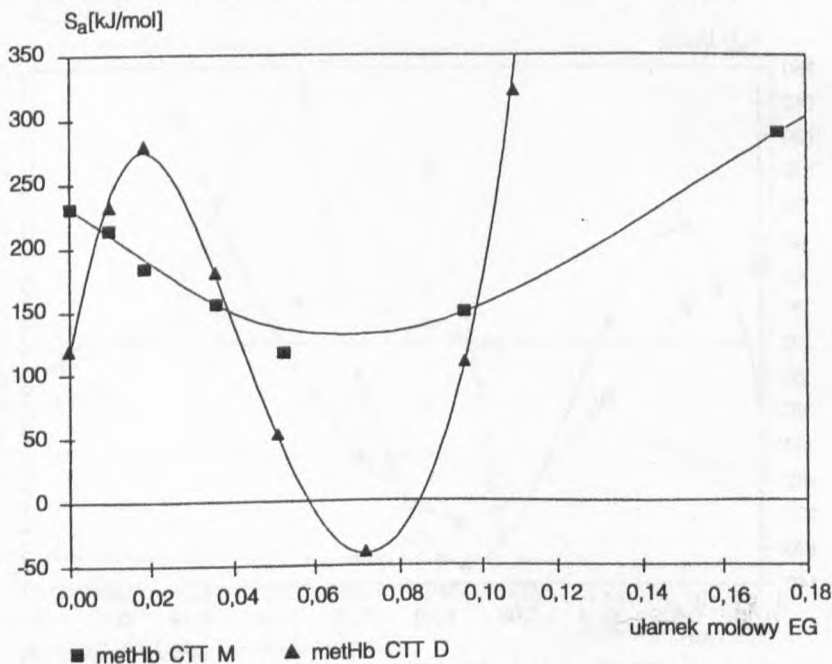
Rys. 3. Energia swobodna denaturacji methHb CTT w obecności EG w pH 3,8 (30°C)



Rys. 4. Energia swobodna denaturacji methHb CTT w obecności EG w pH 6,0 (30°C)



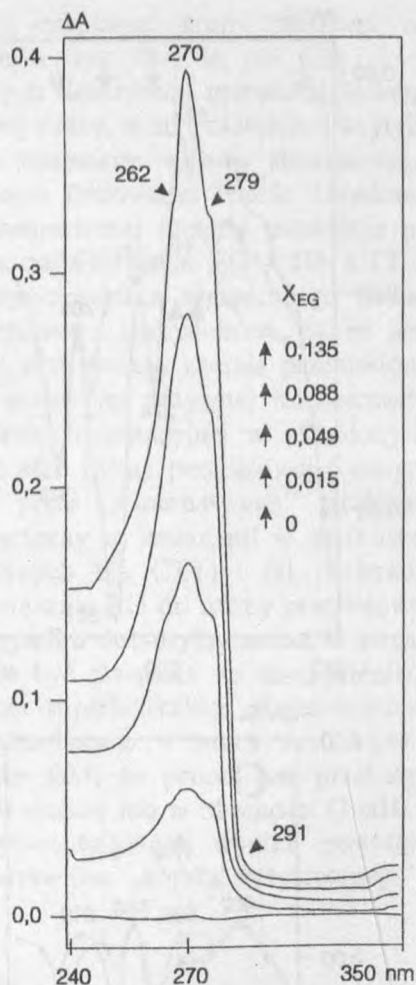
Rys. 5. Entropia denaturacji methHb CTT w obecności EG w pH 3,8



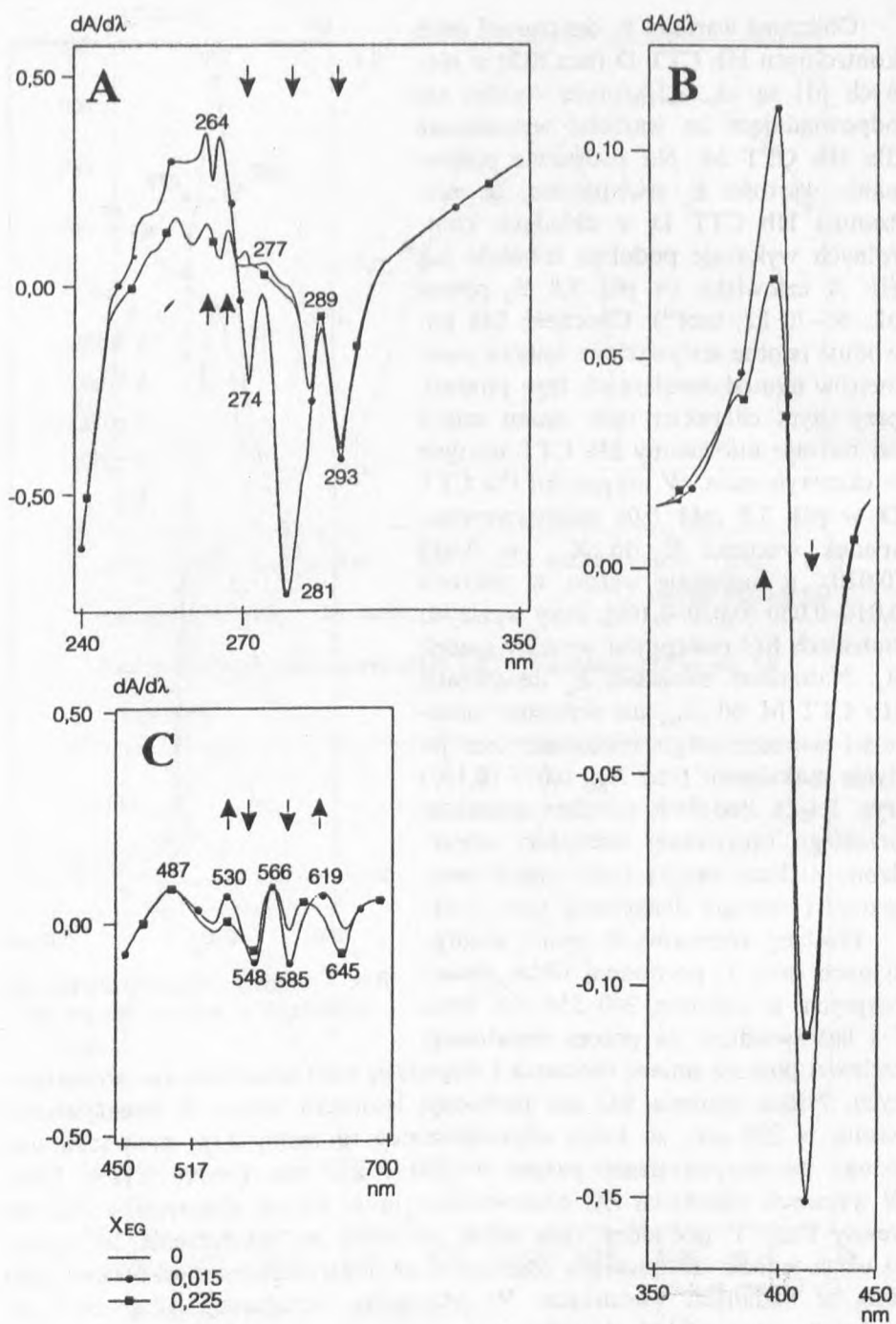
Rys. 6. Entropia denaturacji methHb CTT w obecności EG w pH 6,0

Obliczone wartości E_a denaturacji prób kontrolnych Hb CTT D (bez EG) w różnych pH są ok. 2,5-krotnie większe niż odpowiadające im wartości wyznaczone dla Hb CTT M. Na podstawie porównania wartości E_a stwierdzono, że mieszanina Hb CTT D w układach kontrolnych wykazuje podobną trwałość jak Hb A człowieka (w pH 3,8 E_a równa ok. 60–70 kJ. mol⁻¹). Obecność EG powoduje istotne statystycznie zmiany parametrów termodynamicznych tego procesu, przy czym charakter tych zmian zależy od rodzaju mieszaniny Hb CTT użytych w eksperymencie. W przypadku Hb CTT D w pH 3,8 (pH 6,0) zaobserwowano spadek wartości E_a do $X_{EG} = 0,010$ (0,020), a następnie wzrost w zakresie 0,010–0,050 (0,020–0,100). Przy wyższych stężeniach EG następował wyraźny spadek E_a . Natomiast zależność E_a denaturacji Hb CTT M od X_{EG} nie wykazuje obecności wspomnianego minimum, lecz jedynie maksimum przy $X_{EG} 0,075$ (0,100) (rys. 1 i 2). Podobnie odrębny charakter przebiegu opisywanej zależności stwierdzono podczas analizy zmian energii swobodnej i entropii denaturacji (rys. 3–6).

Przebieg różnicowych widm absorpcyjnych oraz 1. pochodnej widm absorpcyjnych w zakresie 240–350 nm (rys. 7 i 8a) świadczy, że proces denaturacji zachodzi poprzez zmianę otoczenia i ekspozycję reszt aminokwasów aromatycznych. Niskie stężenia EG nie powodują istotnych zmian w intensywności pasma w 291 nm, za które odpowiedzialne są reszty Trp, prowadzą one jednak do uwydatnienia pasma w 270 i 279 nm (reszty Tyr i Phe). W wyższych stężeniach EG obserwowano także wzrost absorpcji w 262 nm (reszty Phe). 1. pochodne tych widm pozwoliły na stwierdzenie, że pasmo to ulega jednak relatywnemu osłabieniu, co sugerowałoby maskowanie tych reszt w badanych warunkach. W przypadku denaturacji alkalicznej nie zaobserwowano efektów maskowania reszt Phe. Przebieg 1. pochodnych widm absorpcyjnych w zakresie 350–700 nm może świadczyć o rozluźnieniu



Rys. 7. Przebieg różnicowych widm absorpcyjnych w zakresie 240–350 nm



Rys. 8. Przebieg 1. pochodnej widm absorpcyjnych

struktury kieszeni hemowej i zwiększonej ekspozycji grupy hemowej, co prowadzi do wytworzenia hemichromogenów (rys. 8b i 8c, pH 6,0).

Pomiary parametrów termodynamicznych denaturacji metodami równowagowymi, które wykorzystano w niniejszej pracy, mimo zasłużonej krytyki [7], są ciągle używane, jednakże przede wszystkim w celu jakościowego opisu wpływu różnych czynników na proces fałdowania białek. Uzyskane wyniki, przy uwzględnieniu ograniczeń zastosowanej metody pozwalają na zasugerowanie następującego mechanizmu oddziaływania EG z Hb CTT.

Dodanie do środowiska wodnego rozpuszczalnika organicznego posiadającego równocześnie właściwości hydrofilowe i hydrofobowe, jakim jest EG, zaburza strukturę przestrzenną wody, a te zmiany zostają przeniesione na cząsteczkę białka, co prowadzi do utraty jej natywnej konformacji. Zmiana charakterystycznej struktury otoczki hydratacyjnej w określonych stężeniach EG powoduje przyjęcie przez białko formy przejściowej o innym ułożeniu domen. Jest ona zastępowana przez „supernatywną” strukturę helikalną. Pierwszy z tych etapów jest związany ze zmianami w strukturze IV (co zostało stwierdzone dla dimerycznych Hb CTT) i III rzędowej, i może być wyjaśnione przez zwiększone wiązanie EG do formy przejściowej niż do natywnej. Etap drugi w takim przypadku dotyczyłby zmian w strukturze II rzędowej. Transformacja ta może być związana ze zmniejszeniem liczby miejsc hydratacyjnych w strukturze superhelikalnej. Przedstawiona propozycja znalazła swe teoretyczne uzasadnienie w pracy A r a k a w y i G o d d e t t e ' a [1]. Na uwagę zasługuje fakt, że proces ten przebiega odmiennie, niż w przypadku denaturacji alkalicznej lub w obecności G u a H C l czy mocznika, która zachodzi jednoetapowo, a w jej wyniku powstają cząsteczki białka charakteryzujące się strukturą tzw. „kłębka statystycznego”.

4. WNIOSKI

1. Hb CTT D wykazują *in vitro* podobną trwałość w pH 3,8 jak Hb A człowieka. Wartość E_a denaturacji Hb CTT D w nieobecności EG jest ok. 2,5-krotnie większa niż odpowiednia wartość dla Hb CTT M, co świadczy o stabilizującym efekcie struktury IV rzędowej.

2. Stwierdzono odrębny przebieg procesu denaturacji w obecności EG dla Hb CTT D i Hb CTT M. Efekt stabilizujący tego związku wykazano jedynie dla X_{EG} 0,010–0,050 (w pH 6,0 0,020–0,100). W całym badanym zakresie stężeń EG powodował jednak istotne zmiany w natywnej organizacji Hb CTT.

3. Proces denaturacji w obecności EG przebiega wieloetapowo poprzez utratę struktury IV rzędowej, wytworzenie hemichromogenów, zmiany

oddziaływań pomiędzy poszczególnymi domenami i wytworzenie struktur superhelikalnych.

4. Sugerowane użycie tego związku jako stabilizatora natywnej organizacji białek [5] jest ryzykowne, ponieważ tylko w wąskim zakresie stężeń nie powoduje on znaczących zmian strukturalnych, aczkolwiek może zaburzać ich właściwości funkcjonalne.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Arakawa T., Goddette D. (1985), *Archiv. Biochem. Biophys.*, **240**, 21–32.
- [2] Clay K. L., Murphy R. C. (1977), *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **39**, 39–43.
- [3] Creighton T. E. (1984), *Adv. Biophys.*, **18**, 1–20.
- [4] Gekko K. (1983), *Stud. Phys. Theor. Chem.*, **27**, 339–358.
- [5] Ghelis C., Yon I. (1982), „Protein Folding”, Academic Press, London, New York, 298–304, 327–331.
- [6] Leyko W., Osmulski P. A. (1985), *Comp. Biochem. Physiol.*, **80B**, 613–616.
- [7] Tanford C., Goddette D. (1985), *Archiv. Biochem. Biophys.*, **240**, 21–32.

Wpłynęło do Redakcji
„Folia biochimica et biophysica”
28.03.1994

Katedra Biofizyki
Skażeń Środowiska
Uniwersytetu Łódzkiego

Paweł A. Osmulski, Wirgiliusz Duda, Piotr Duchnowicz

STABILITY OF HEMOGLOBIN *CHIRONOMUS THUMMI THUMMI* IN THE SYSTEM OF SOLVENTS WATER-ETHYLENE GLYCOL

Studies of mechanism of denaturation of Hb CTT

Qualitative analysis of the effect of ethylene glycol (EG) on the stability of the native structure of monomeric and dimeric methemoglobins isolated from larvae of *Chironomus thummi thummi* (CTT Hb) was performed by measurements of thermodynamic parameters of denaturation employing the equilibrium method. Results of denaturation studies at various pH conditions demonstrate that the stability of dimeric CTT Hb is close to that of human Hb while monomeric components show a higher lability. The dependence of denaturation enthalpy on the EG concentration is slightly different for monomeric and dimeric components. For dimeric Hb a considerable decrease of denaturation energy was found already at very low EG concentration which is probably due to the disturbance of interaction between the dimeric – forming chains and, as a consequence, to their dissociation. The further course of the curves is similar for both Hb derivatives: an increase in the denaturation energy is observed, peaking at the EG molar fraction of 0.04–0.05, followed by its rapid decrease. The obtained results are in agreement with the following hypothesis. The structural and dynamic stability of globular proteins is controlled by interactions with the surrounding water

molecules. Addition of an organic solvent, possessing both hydrophilic and hydrophobic properties as EG, to the medium, disturbs the native protein conformation by change of the structure of its hydration shell. At appropriate concentrations, EG makes the protein to acquire the supernative structure which is reflected by changes in absorption spectra in the UV range demonstrating alterations in the surrounding of the hydrophobic residues. Higher EG concentrations are sufficient to form a new hydration shell of the protein molecule enducing its different special organization.