

酸性条件下两种马来酸-烯烃交替共聚物诱导 细胞色素 c 的结构转换^{*}

梁 丽 姚 萍^{**} 江 明

(复旦大学聚合物分子工程教育部重点实验室 高分子科学系 上海 200433)

摘 要 在 $\text{pH} = 2.9$ 时,细胞色素 c 保持类天然的结构;和马来酸-烯烃交替共聚物作用后,细胞色素 c 的 α -螺旋结构基本保持不变,但是三级结构被破坏.另一方面,在 $\text{pH} = 2.1$ 时,细胞色素 c 去折叠形成伸展的无规卷曲构象;马来酸-烯烃交替共聚物可以诱导酸变性的细胞色素 c 从无规卷曲构象转变为 α -螺旋结构.在酸性溶液中,由于马来酸-异丁烯交替共聚物和细胞色素 c 之间更强的相互作用,其对蛋白质结构的影响大于马来酸-1-十四烯交替共聚物.相对于小分子,聚合物可以在低浓度条件下提供有利于蛋白质结构转换的微环境.

关键词 交替共聚物, 自组装, 分子聚集体

蛋白质的结构转换,包括折叠与去折叠,是蛋白质研究的重要领域.蛋白质的正确折叠是体现其生物功能的基础,也是生物学中最基本和最普遍的组装模式.新生肽链在体内如何折叠主要取决于其一级结构和肽链所处的细胞环境,一般而言,蛋白质能自发地折叠成具有特定空间结构和生物功能的分子,但是环境因素的改变会使肽链发生结构转换.近年来的医学研究发现,蛋白质在人体内的结构转换和错误折叠会引起严重的疾病^[1].另一方面,重组蛋白质在大肠杆菌中的高效表达常常导致无活性的蛋白质聚集体,即包涵体的生成^[2].因此,研究蛋白质折叠的机理和发展促使蛋白质复性的方法无论在理论上还是在应用上都有很重要的意义.

细胞色素 c 是呼吸链电子传递的一个中间体,通过血红素辅基在细胞色素 c 还原酶和细胞色素 c 氧化酶之间传递电子.另外,细胞色素 c 也具有诱导细胞凋亡的作用.细胞色素 c 是由一条包含 104 个氨基酸残基的多肽链和血红素组成,血红素通过 Cys14 和 Cys17 形成两个硫醚键将血红素共价连接在肽链上,血红素上的铁原子与 His18 和 Met80 以配位键相连,细胞色素 c 的二级结构主要是 α -螺旋结构,等电点 $\text{pH} = 10.6$ ^[3].随着溶液 pH 降低,细胞色素 c 所带正电荷增加,静电斥力使得蛋白质的天然紧密结构被破坏.在 pH

$= 2.0$ 和低离子强度的溶液中,细胞色素 c 去折叠形成伸展结构^[4].Goto 等的研究表明,各种小分子强酸,如硫酸、高氯酸、硝酸、三氯乙酸以及三氟乙酸和它们相应的负离子盐可以诱导酸变性的细胞色素 c 部分折叠,并且这些负离子盐诱导细胞色素 c 折叠的程度与其对负离子交换树脂的静电吸附顺序相一致,表明负离子主要是通过静电相互作用屏蔽细胞色素 c 内部的静电排斥从而诱导蛋白质折叠^[5].大量关于磷脂和表面活性剂与细胞色素 c 之间相互作用的研究表明,疏水作用也是诱导细胞色素 c 结构转换的驱动力^[6~8].

随着高分子科学的迅速发展,人们已经可以通过分子设计将具有环境响应性质的疏水和亲水结构单元以不同的组合方式连接于合成高分子中,它们不但在单分子状态具有可调节和环境响应的结构变换及疏水-亲水平衡,还能形成可控尺寸的自组装,并且自组装的形成和结构也受到诸如温度、 pH 、离子强度等条件的控制.合成聚合物与蛋白质之间的相互作用已经被广泛研究^[9,10].蛋白质与带相反电荷的聚合物作用后,根据溶液中聚合物和蛋白质的浓度以及溶液 pH 和离子强度的不同,可以形成可溶性的复合物、凝聚物或者沉淀.因此,聚合物可以用来分离和纯化蛋白质、固定和稳定酶、促进蛋白质折叠、包埋和输送蛋白质.在包埋和输送蛋白质的研究中,聚合物和蛋白

质相互作用形成的微米或纳米粒子可以保护和帮助蛋白质通过一些特殊的屏障到达指定组织而发挥作用^[11]。

聚合物和蛋白质之间可以发生静电、疏水和氢键等作用,而这些作用也是维持蛋白质结构的重要因素和诱导蛋白质结构转换的驱动力^[12]。因此,聚合物和蛋白质之间的相互作用可能影响蛋白质的结构。马来酸与烯烃共聚物及其衍生物是一系列表征十分清楚的聚合物。共聚物的结构是由羧酸基团的离子化程度和烷基链的长度共同决定的,具有长烷基侧链的共聚物在低 pH 时倾向于发生聚集形成胶束;而烷基侧链较短的共聚物在高 pH 时则具有伸展的结构。这类共聚物和蛋白质的相互作用与共聚物中羧酸基团的离子化程度以及烷基侧链的疏水性有关^[13]。我们选择了两个马来酸-烯烃交替共聚物,马来酸-异丁烯交替共聚物(PIMA)和马来酸-1-十四烯交替共聚物(PTMA),用圆二色性光谱、荧光光谱和吸收光谱表征了在酸性溶液中聚合物和蛋白质之间的疏水和静电作用对细胞色素 c 结构的影响。细胞色素 c 在 pH 2.5 时由天然态向去折叠态转变^[14],因此,我们分别研究了溶液 pH 为 2.9 和 2.1 时聚合物对细胞色素 c 结构的影响。在 pH 2.9 和 2.1 时根据电位滴定计算出 PIMA 的电离度分别为 27% 和 11%,PTMA 的电离度分别为 36% 和 8%^[15]。研究聚合物和蛋白质复合物在酸性条件下对蛋白质结构的影响也可以帮助我们了解复合物作为口服药物时在人体胃中的酸性条件下(pH < 3)的性质。

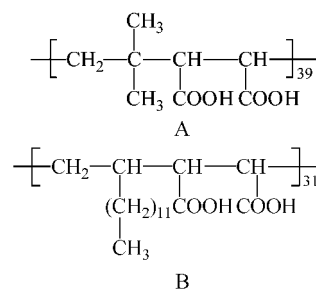
1 实验部分

1.1 样品

马来酸酐-异丁烯交替共聚物,分子量 6000,重复单元数 39;马来酸酐-1-十四烯交替共聚物,分子量 9000,重复单元数 31,购于 Aldrich 公司。PIMA 和 PTMA 是通过将相应酐的共聚物在碱性溶液中水解制备的^[15],结构如示意图 1。然后分别用 10 mmol/L pH = 2.9 磷酸缓冲液和 pH = 2.1 HCl 溶液制备浓度为 4.5×10^{-4} g/mL 的 PIMA 和 PTMA 储备液。

马心细胞色素 c,分子量 12384,购于 Sigma 公司。细胞色素 c 溶液的浓度用紫外-可见光谱法测定,其在 409 nm 的摩尔消光系数为 1.06×10^5 (mol/L)⁻¹·cm⁻¹。

取适量马来酸-烯烃交替共聚物储备液加至 10 mmol/L pH = 2.9 磷酸缓冲液或者 pH = 2.1 盐酸溶液中,然后边摇晃边滴加细胞色素 c 溶液。在 pH = 2.9 和 2.1 时,细胞色素 c 的终浓度分别为 10 和 7 μmol/L。混合溶液在室温下放置至少 12 h 以后进行各种测试。



Scheme 1 The structure of PIMA (a) and PTMA (b)

1.2 圆二色性光谱

圆二色性光谱(CD)的测定使用 J-715 型圆二色谱仪(JASCO Corporation, Japan),扫描速度为 200 nm/min,响应时间为 0.5 s,分辨率为 0.2 nm,带宽为 1.0 nm,测量累加次数为 8 次。在远紫外区(190 ~ 250 nm)使用 0.1 cm 比色皿,在近紫外(250 ~ 350 nm)及可见区(350 ~ 500 nm)使用 1 cm 比色皿。氮气流量为 5 ~ 10 L/min。测量温度为 25℃。

1.3 紫外-可见吸收光谱

在室温下,紫外-可见吸收光谱(UV-Vis)在 Lambda 35 型紫外-可见吸收光谱仪(Perkin Elmer)上测量。样品池为 1 cm 比色皿。

1.4 稳态荧光光谱

在室温下,细胞色素 c 的色氨酸荧光光谱在 FLS-920 型荧光光谱仪(Edinburgh Instruments)上测量。激发和发射的光谱分辨率分别为 0.5 和 1 nm。激发波长为 295 nm。

2 结果与讨论

2.1 在 pH = 2.9 时 PIMA 和 PTMA 诱导细胞色素 c 去折叠

天然态细胞色素 c 在远紫外区有负的双吸收峰,分别位于 208 和 222 nm,是典型的 α -螺旋结构;在近紫外区的 CD 光谱比较复杂,目前归属得比较清楚的是色氨酸的吸收,即在 282 和 288 nm 的两个负峰对应于 Trp59 的不对称环境^[16]。细胞色素 c 的 Soret CD 光谱分别在 405 和 417 nm 有正和负的吸收峰,是血红素疏水袋结构完整性的一

个特征指纹,来源于血红素与 Trp59,Tyr67,Phe82 之间的相互作用,这些氨基酸残基位于 Met80 一侧,所以 Soret CD 谱的变化主要反映了这一部分的结构扰动.在 pH 为 2.9 时,细胞色素 c 的 CD 光谱与天然态基本相似(图 1),与中性 pH 时相比,仅近紫外 CD 光谱中 288 nm 处的吸收有轻微减弱和 Soret 带的光谱有轻微蓝移,表明细胞色素 c 仍然保持其类天然的结构.

图 1 显示出在 pH 2.9 时 PIMA 和 PTMA 对细胞色素 c 结构的影响.和 3.6×10^{-5} g/mL PIMA 作用后,细胞色素 c 的远紫外 CD 光谱并没有发生明显变化,仍然在 208 nm 和 222 nm 有负的双吸收峰,表明细胞色素 c 的二级结构仍然主要是 α -螺旋结构.相似地,与 3.6×10^{-5} g/mL 和 1.4×10^{-4} g/mL PTMA 作用后,细胞色素 c 在 222 nm 的吸收峰没有变化,表明 α -螺旋含量保持不变.但是细胞色素 c 和 PTMA 作用后在 208 nm 的吸收峰明显增加,这与磷脂诱导细胞色素 c 去折叠的结果一致,其原因目前还不是十分清楚,可能与其它二级结构的变化有关,或者也可能和具有光学活性的血红素的结构变化有关^[6].随着 PTMA 浓度增加,细胞色素 c 在近紫外区 282 nm 和 288 nm 的两个负峰逐渐消失,表明 PTMA 破坏了细胞色素 c 中 Trp59 不对称环境.细胞色素 c 和 3.6×10^{-5} g/mL PIMA 作用后,近紫外区 CD 光谱中的两个负峰基本消失,光谱整体下移,这与酸性条件下变性的木瓜蛋白酶的近紫外区 CD 光谱变化相似,表明蛋白质的三级结构被破坏^[17].另外,和 3.6×10^{-5} g/mL PIMA 作用后,细胞色素 c 在 Soret 区 417 nm 的负峰消失,而在 402 nm 处的正峰增强并移至 405 nm,表明血红素疏水袋结构的完整性也遭到了破坏.但是, 3.6×10^{-5} g/mL PTMA 对细胞色素 c 血红素疏水袋结构完整性的影响非常弱;进一步增加 PTMA 浓度至 1.4×10^{-4} g/mL 时,PTMA 对 Soret 区 CD 光谱的影响才接近于 3.6×10^{-5} g/mL PIMA 的影响.这些结果表明在 pH 2.9 时,共聚物和细胞色素 c 的相互作用明显破坏了细胞色素 c 的三级结构,并且在相同浓度时 PIMA 对血红素疏水袋结构完整性的破坏大于 PTMA.

紫外-可见吸收光谱反映出血红素中 Fe 原子的配位情况.天然细胞色素 c 在 409 nm 的 Soret 带吸收峰对应于血红素铁原子的强场低自旋六配位状态.酸变性细胞色素 c 的 Soret 带吸收峰蓝移至 395 nm 左右,表明血红素铁原子的两个轴向配体

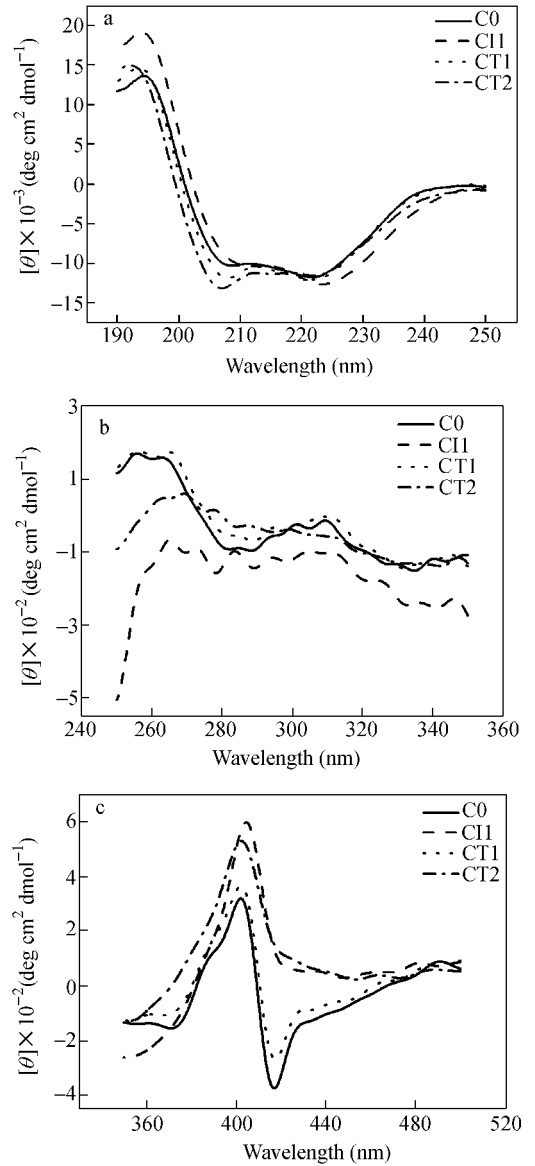


Fig. 1 (a) Far-UV, (b) near-UV, (c) soret region of CD spectra of cytochrome c without and with the alternating copolymers of maleic acid and alkene at pH 2.9
C0 is cytochrome c alone ;C11 is the mixture of cytochrome c with 3.6×10^{-5} g/mL PIMA ;CT1 and CT2 are the mixtures of cytochrome c with 3.6×10^{-5} g/mL and 1.4×10^{-4} g/mL PTMA, respectively. The concentration of cytochrome c is 10 μ mol/L.

被溶剂分子取代而变为弱场高自旋态^[14].图 2 是在 pH 为 2.9 时,PIMA 和 PTMA 对细胞色素 c Soret 带吸收的影响.在 pH 为 2.9 时,细胞色素 c 溶液的 Soret 带吸收峰仍然在 409 nm,表明血红素铁原子仍然处于强场低自旋六配位状态.当与浓度为 3.6×10^{-5} g/mL 的 PIMA 和 PTMA 作用后,细胞色素 c 的 Soret 带吸收从 409 nm 分别蓝移至 404 nm 和 407 nm,表明 PIMA 对细胞色素 c 结构的影

响大于 PTMA. 当增加 PTMA 的浓度至 1.4×10^{-4} g/mL 后, 细胞色素 c 的 Soret 带吸收峰蓝移至 401 nm. 由于 1.4×10^{-4} g/mL PIMA 和 $10 \mu\text{mol/L}$ 细胞色素 c 混合溶液的浊度很大, 因此没有对其作进一步的研究.

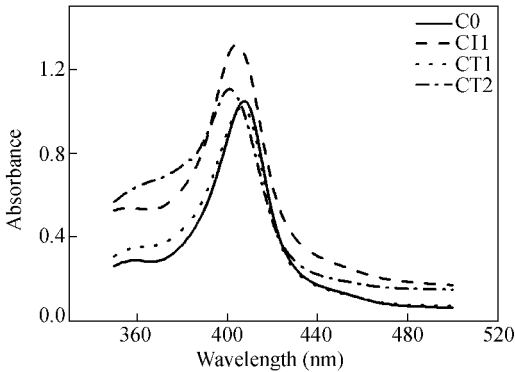


Fig. 2 Soret region absorption spectra of cytochrome c without and with the alternating copolymers of maleic acid and alkene at pH 2.9. C0 is cytochrome c alone; C11 is the mixture of cytochrome c with 3.6×10^{-5} g/mL PIMA; CT1 and CT2 are the mixtures of cytochrome c with 3.6×10^{-5} g/mL and 1.4×10^{-4} g/mL PTMA, respectively. The concentration of cytochrome c is $10 \mu\text{mol/L}$.

我们以前的研究表明, 在 pH = 7.4 时, PIMA 对细胞色素 c 的 α -螺旋结构和 Trp59 的不对称环境没有影响, 而仅对血红素疏水袋结构的完整性有弱的影响^[18]. 在 pH = 2.9 时, 虽然细胞色素 c 的 α -螺旋结构仍然被保持, 但是, 与 PIMA 作用后细胞色素 c 的 Trp59 的不对称环境和血红素疏水袋结构的完整性均被破坏. 也就是说, 随着溶液 pH 从 7.4 调节到 2.9, PIMA 对细胞色素 c 三级结构的影响有明显增加, 但是对二级结构的影响仍然很小. 这与 Sedlak 和 Antalík 研究聚乙烯基磺酸 (PVS) 与细胞色素 c 的相互作用相似. PVS 和细胞色素 c 发生静电作用以后, 在中性溶液中细胞色素 c 保持类天然的结构, 而在弱酸性溶液中细胞色素 c 的三级结构被破坏, 但仍然保持 α -螺旋结构^[19]. 当溶液 pH 从中性降低到酸性时, 细胞色素 c 所带的净正电荷增加, 静电斥力导致自身的不稳定性增加以及和带相反电荷的 PIMA 之间的静电吸引增加, 因此使得 PIMA 对细胞色素 c 结构的影响增加.

在 pH = 2.9 时, PIMA 对细胞色素 c 的三级结构和血红素疏水袋结构完整性的影响大于 PTMA. 而在中性溶液中正好相反^[18]. 这可能是由于在中性溶液中 PTMA 带有更多的负电荷, 静电

排斥使得 PTMA 粒子发生解离, 因此 PTMA 的疏水侧链可以和细胞色素 c 的疏水残基发生作用, 使得细胞色素 c 的疏水核遭到破坏. 而在酸性溶液中, PTMA 发生疏水聚集. 我们的光散射测量证明了当 PTMA 的浓度稀释到 4.5×10^{-6} g/mL 时, 在酸性溶液中其粒径和粒径分布没有明显的变化, 而在中性溶液中大部分的粒子解离^[20]; 用苾做探针进行的荧光分析也证明了在酸性溶液中 PTMA 粒子的疏水性比在中性时更强^[15]; 这表明 PTMA 粒子在酸性溶液中更稳定, 即长疏水烷基侧链被包裹在粒子内部, 不利于和蛋白质发生疏水作用, 并且 PTMA 的疏水聚集也会降低其有效浓度. 而在酸性水溶液中, PIMA 具有伸展的结构^[20]. 另外, 在 pH = 2.9 时, 相同聚合物质量浓度时 PIMA 所带的负电荷是 PTMA 的 1.5 倍. 这些因素使得在 pH = 2.9 时 PIMA 和细胞色素 c 之间的作用强于 PTMA, 因此对细胞色素 c 结构的影响更大.

2.2 在 pH = 2.1 时 PIMA 和 PTMA 诱导酸变性细胞色素 c 折叠

在 pH = 2.1 溶液中, 细胞色素 c 在近紫外区 282 和 288 nm 两个负峰消失, 表明 Trp59 不对称环境被破坏; 在 Soret 区 417 nm 负峰消失而 405 nm 处的峰强增加并蓝移至 397 nm, 表明血红素疏水袋结构的完整性被破坏; 在远紫外区, 208 和 222 nm 的两个负吸收峰消失, 而在 200 nm 左右出现一新的吸收峰, 表明细胞色素 c 由 α -螺旋结构转变为伸展的无规卷曲构象. 带负电荷的磷脂或者 SDS 以及各种小分子强酸和相应的阴离子盐可以诱导酸变性的细胞色素 c 从无规卷曲构象转变为 α -螺旋结构^[5,6,8]. 在 pH = 2.9 时, 马来酸-烯烃交替共聚物和细胞色素 c 的相互作用破坏了细胞色素 c 的三级结构, 但是对蛋白质的 α -螺旋结构影响非常小. 因此, 我们推测马来酸-烯烃交替共聚物也可能诱导酸变性的细胞色素 c 形成 α -螺旋结构. 图 3 是在 pH = 2.1 时, PIMA 和 PTMA 对细胞色素 c 的远紫外 CD 光谱的影响. 在 3.6×10^{-5} g/mL PIMA 溶液中, 细胞色素 c 的远紫外 CD 光谱中 200 nm 处的吸收峰消失, 同时在 208 nm 和 222 nm 处出现新的吸收峰, 表明 PIMA 诱导酸变性的细胞色素 c 从无规卷曲构象转变为 α -螺旋结构. 然而, 在 3.6×10^{-5} g/mL PTMA 溶液中, 细胞色素 c 的远紫外 CD 光谱在 200 nm 处有负吸收峰, 表明细胞色素 c 仍然是无规卷曲构象. 将

PTMA 的浓度增加到 1.4×10^{-4} g/mL 时,远紫外 CD 光谱中 200 nm 处的吸收减少,而在 203 nm 和 222 nm 出现新的吸收峰,表明 PTMA 也可以诱导细胞色素 c 的二级结构发生改变.但是,细胞色素 c 的近紫外和 Soret CD 光谱表明在 PIMA 或者 PTMA 的存在下,282 和 288 nm 的两个负峰并没有出现,417 nm 的负峰也没有出现,这说明细胞色素 c 的三级结构并没有恢复.

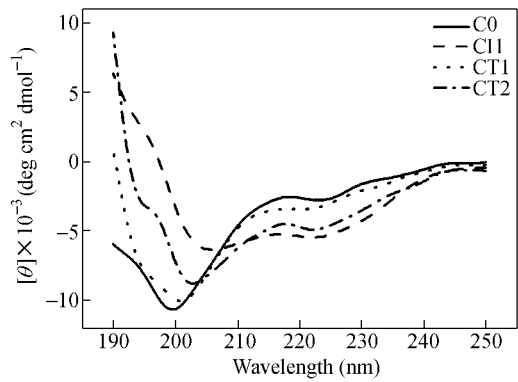


Fig. 3 Far-UV CD spectra of cytochrome c without and with the alternating copolymers of maleic acid and alkene at pH 2.1
C0 is cytochrome c alone ;C11 is the mixture of cytochrome c with 3.6×10^{-5} g/mL PIMA ;CT1 and CT2 are the mixtures of cytochrome c with 3.6×10^{-5} g/mL and 1.4×10^{-4} g/mL PTMA, respectively. The concentration of cytochrome c is 7 μ mol/L.

蛋白质的自身荧光常被用来研究蛋白质的结构转换.细胞色素 c 只有一个色氨酸 Trp59,在天然结构下由于 Trp59 距离卟啉太近,其荧光被猝灭,所以峰值在 328 nm 处的荧光强度很弱.当天然结构被破坏时,Trp59 与卟啉的距离增加,荧光强度也随之增加.在 pH = 2.1 时,细胞色素 c 在 342 nm 有很强的荧光峰,表明细胞色素 c 的天然结构被破坏,Trp59 处于一个比较亲水的环境中.在 3.6×10^{-5} g/mL PIMA 作用下,Trp59 荧光的最大峰值蓝移了 6 nm,光强下降.而当 PTMA 浓度也为 3.6×10^{-5} g/mL 时,荧光峰值只蓝移了 1 nm ;增加 PTMA 浓度到 1.4×10^{-4} g/mL 时,最大峰值蓝移了 5 nm,光强也有较大幅度的降低.与细胞色素 c 的天然结构相比,和共聚物作用以后,Trp59 荧光的光强仍然很强,最大峰值的波长在 336 nm 左右,表明细胞色素 c 虽然有一定程度的塌缩,但仍然处于非天然的结构状态.

PIMA/PTMA 和酸变性细胞色素 c 作用以后的 CD、荧光光谱与磷脂和酸变性细胞色素 c 作用后的光谱^[6] 非常相似,说明 PIMA/PTMA 和磷脂一

样,可以诱导酸变性细胞色素 c 从无规卷曲到 α -螺旋结构的转变,但不能诱导其形成天然的三级结构.在诱导折叠的过程中,当共聚物的浓度为 3.6×10^{-5} g/mL 时,PIMA 对细胞色素 c 的诱导效果大于 PTMA,只有当增加 PTMA 浓度时,PTMA 才能接近 PIMA 的诱导效果.

各种小分子负离子诱导酸变性的细胞色素 c 折叠的程度与其对阴离子交换树脂的静电吸附顺序相一致,表明静电相互作用是诱导蛋白质折叠的主要因素^[5]. Ali 等的研究表明,中性的疏水荧光染料,如尼罗红不能诱导酸变性的细胞色素 c 发生明显的结构转换;而带负电荷的疏水染料,如 1-氨基-8-萘磺酸 (ANS) 可以诱导酸变性的细胞色素 c 折叠形成 α -螺旋结构^[21].因此在酸性条件下,静电作用是诱导细胞色素 c 折叠的主要驱动力.在 pH = 2.1 时,细胞色素 c 带有 24 个正电荷^[7].在 3.6×10^{-5} g/mL PIMA 和 7 μ mol/L 细胞色素 c 的混合溶液中,PIMA 的负电荷和细胞色素 c 的正电荷之比为 0.3,两者之间的静电吸引抵消了一部分蛋白质内部的静电排斥,促进了细胞色素 c 折叠.在 pH = 2.1,在相同聚合物质量浓度时 PTMA 所带的负电荷大约只有 PIMA 的三分之一.另外,PTMA 发生疏水聚集形成稳定的纳米粒子可能降低 PTMA 的有效浓度.这些因素使得 PTMA 和酸变性细胞色素 c 之间的静电吸引作用以及诱导蛋白质形成 α -螺旋结构的作用弱于 PIMA.这一结果与 PIMA 和 PTMA 在 pH = 2.1 时诱导脱辅基细胞色素 c 折叠的结论相同^[15].

3.6×10^{-5} g/mL PIMA 溶液中羧酸基团的总浓度约为 0.5 mmol/L.我们用 CD 光谱研究了小分子马来酸和细胞色素 c 的相互作用.当溶液中羧酸基团的浓度达到 2 mmol/L 时,在 pH = 2.9 和 2.1 时马来酸基本上对细胞色素 c 和酸变性细胞色素 c 的结构没有影响.Goto 等的研究表明三氯乙酸和三氟乙酸诱导酸变性细胞色素 c 形成 α -螺旋的浓度中点分别是 6.3 mmol/L 和 84 mmol/L^[5].对马来酸-烯烃交替共聚物而言,其羧酸基团和烷基侧链被束缚在聚合物主链上,造成官能团在溶液中分布不均匀,而小分子在溶液中是均匀分布的,因此聚合物可以在很低浓度时提供有利于蛋白质结构变化的微环境,在体外促进蛋白质折叠^[22].

REFERENCES

- 1 Ellis R J, Pinheiro T J T. *Nature*, 2002, 416(6880) : 483 ~ 484
- 2 Clark E D B. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12(2) : 202 ~ 207
- 3 Noritomi H, Hidaka Y, Kato S, Nagahama K. *Biotechnology Techniques*, 1999, 13(3) : 181 ~ 183
- 4 Goto Y, Hagihara Y, Hamada D, Hoshino M, Nishii I. *Biochemistry*, 1993, 32(44) : 11878 ~ 11885
- 5 Goto Y, Takahashi N, Fink A L. *Biochemistry*, 1990, 29(14) : 3480 ~ 3488
- 6 Sanghera N, Pinheiro T J T. *Protein Science*, 2000, 9(6) : 1194 ~ 1202
- 7 Chattopadhyay K, Mazumdar S. *Biochemistry*, 2003, 42(49) : 14606 ~ 14613
- 8 Xu Q, Keiderling T A A. *Protein Science*, 2004, 13(11) : 2949 ~ 2959
- 9 Fisher R R, Glatz C E. *Biotechnology and Bioengineering*, 1988, 32(6) : 777 ~ 785
- 10 Margolin A L, Sherstyuk S F, Izumrudov V A, Zezin A B, Kabanov V A. *European Journal of Biochemistry*, 1985, 146(3) : 625 ~ 632
- 11 Dai C Y, Wang B C, Zhao H W. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 2005, 41(2-3) : 117 ~ 120
- 12 Dill K A. *Biochemistry*, 1990, 29(31) : 7133 ~ 7155
- 13 Bianchi E, Ciferri A, Parodi R, Rampone R, Tealdi A. *The Journal of Physical Chemistry*, 1970, 74(5) : 1050 ~ 1056
- 14 Babul J, Stellwagen E. *Biochemistry*, 1972, 11(7) : 1195 ~ 1200
- 15 Liang L, Yao P, Jiang M. *Biomacromolecules*, 2005, 6(5) : 2748 ~ 2755
- 16 Myer Y P. *Biochemistry*, 1968, 7(2) : 765 ~ 776
- 17 Fink A L, Calciano L J, Goto Y, Kurotsu T, Palleros D R. *Biochemistry*, 1994, 33(41) : 12504 ~ 12511
- 18 Liang L, Yao P, Jiang M. *Biomacromolecules*, 2006, 7(6) : 1829 ~ 1835
- 19 Sedlak E, Antalík M. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) / Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1999, 1434(2) : 347 ~ 355
- 20 Liang L, Yao P, Jiang M, Zhang G, Yan Y. *Langmuir*, 2005, 21(23) : 10662 ~ 10670
- 21 Ali V, Prakash K, Kulkarni S, Ahmad A, Madhusudan K P, Bhakuni V. *Biochemistry*, 1999, 38(41) : 13635 ~ 13642
- 22 Lu Diannan (卢滇楠), Liu Zheng (刘铮). *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2004, (4) : 573 ~ 579

STRUCTURAL TRANSITION OF CYTOCHROME c INDUCED BY THE ALTERNATING COPOLYMERS OF MALEIC ACID AND ALKENE IN ACIDIC SOLUTIONS

LIANG Li, YAO Ping, JIANG Ming

(Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers and Department of Macromolecular Science, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract The interaction of cytochrome c with two copolymers : poly(isobutylene-*alt*-maleic acid) (PIMA) and poly(1-tetradecene-*alt*-maleic acid) (PTMA) was studied in this report to investigate the electrostatic and hydrophobic influence of the copolymers on the structure of cytochrome c at acidic conditions. UV-Vis, circular dichroism and intrinsic tryptophan fluorescence were measured to study the secondary structure, Soret structure and tryptophan environment of cytochrome c. Cytochrome c maintains its native-like structure at pH = 2.9. After interacting with the alternating copolymers of maleic acid and alkene at pH = 2.9, the α -helical structure of cytochrome c is basically unchangeable, whereas its tertiary structure is destroyed. On the other hand, at pH = 2.1, cytochrome c unfolds to random coil, and the alternating copolymers can induce a structural transition to α -helical structure for the acid-denatured cytochrome c but cannot induce the tertiary structure. In acidic solutions with lower copolymer concentration, the influence of PIMA on cytochrome c structure is stronger than that of PTMA, but at higher PTMA concentrations PTMA can reach similar effect as PIMA. The reason may be that at the same copolymer weight concentration, PIMA carries more negative charges therefore has stronger electrostatic interaction with cytochrome c, and that PTMA forms stable particles with hydrophobic cores which may decrease its effective concentration and decrease the interaction with cytochrome c. Compared to small molecules, the polymeric structure provides a favorable microenvironment for the structural transition of protein at very low copolymer concentrations.

Key words Alternating copolymer of maleic acid and alkene, Cytochrome c, Structural transition