



УДК 577.354.2

ТОЧЕЧНЫЕ АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ В Ca^{2+} -СВЯЗЫВАЮЩИХ ЦЕНТРАХ РЕКОВЕРИНА.

II. НЕОБЫЧНОЕ ПОВЕДЕНИЕ БЕЛКА ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ИОНАМИ КАЛЬЦИЯ

© 2000 г. В. Н. Уверский, С. Е. Пермяков, И. И. Сенин*, А. М. Черская,
С. В. Шульга-Морской**, Д. В. Зинченко**, А. М. Алексеев**,
А. А. Заргаров**, В. М. Липкин**, П. П. Филиппов*, Е. А. Пермяков[#]

Институт биологического приборостроения РАН, 142292, Пуцино, Московская обл.;

*НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ;

**Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
142292, Пуцино, Московская обл.

Поступила в редакцию 11.03.99 г. Принята к печати 31.05.99 г.

Структурные свойства миристоилированных форм рекомбинантного рековерина дикого типа и его мутантов с “испорченными” 2-м и(или) 3-м Ca^{2+} -связывающими центрами исследовали методами флуоресценции и кругового дихроизма. Показано, что взаимодействие рековерина дикого типа с ионами кальция сопровождается необычными структурными перестройками белковой молекулы. В частности, связывание ионов Ca^{2+} белком делает окружение его триптофановых остатков более подвижным, тогда как вторичная структура белка не претерпевает существенных изменений; при этом заметно увеличивается гидрофобность белковой молекулы и возрастает ее термостабильность (тепловой переход сдвигается на 15°C в сторону более высоких температур). Сходные структурные Ca^{2+} -индуцируемые изменения характерны также для мутанта рековерина –EF2, у которого 2-й Ca^{2+} -связывающий центр изменен таким образом, что он не способен связывать ионы кальция. Структурные свойства мутантов –EF3 и –EF2,3, у которых модифицированы и “испорчены” соответственно 3-й и одновременно 2-й и 3-й Ca^{2+} -связывающие центры, практически не зависят от присутствия ионов кальция.

Ключевые слова: фоторецепция; кальцийсвязывающие белки; рековерин; сайт-направленный мутагенез; флуоресценция; круговой дихроизм.

ВВЕДЕНИЕ

В предыдущей работе [1] данной серии были описаны Ca^{2+} -связывающие свойства миристоилированных форм рекомбинантного рековерина дикого типа (wt-рековерин) и трех его мутантов: “–EF2” с заменой Glu85Gln во 2-м Ca^{2+} -связывающем центре, “–EF3” с заменой Glu121Gln в 3-м Ca^{2+} -связывающем центре и “–EF2,3” с двумя одновременными заменами Glu85Gln и Glu121Gln соответственно во 2-м и 3-м Ca^{2+} -связывающих центрах. В том числе было показано, что связывание ионов кальция рековерином дикого типа происходит постадийно, причем сначала заполняется 3-й, а затем – 2-й Ca^{2+} -связывающие центры

белка. Цель настоящей работы – исследование влияния связывания Ca^{2+} рековерином и тремя перечисленными выше мутантами на их структурные свойства и конформационную стабильность.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние связывания ионов кальция рековерином и его мутантами на их спектры собственной флуоресценции. Вопрос о Ca^{2+} -индуцируемом изменении спектров собственной флуоресценции рековерина и его мутантных форм с заменами в Ca^{2+} -связывающих центрах подробно рассматривался в первой работе данной серии [1]. В частности, отмечалось, что при связывании Ca^{2+} имеет место длинноволновый сдвиг спектра триптофановой флуоресценции и некоторое увеличение ее квантового выхода. В соответствии с величиной Ca^{2+} -индуцированного длинноволнового сдвига

Сообщение I см. [1].

Сокращения: ANS – 8-анилино-1-нафталинсульфонокислота; EGTA – этиленгликоль-бис(β-аминоэтил)-N,N'-тетрауксусная кислота.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 924-57-49; факс: (827) 79-05-22; e-mail: permyakov@ibp.serpukhov.su).

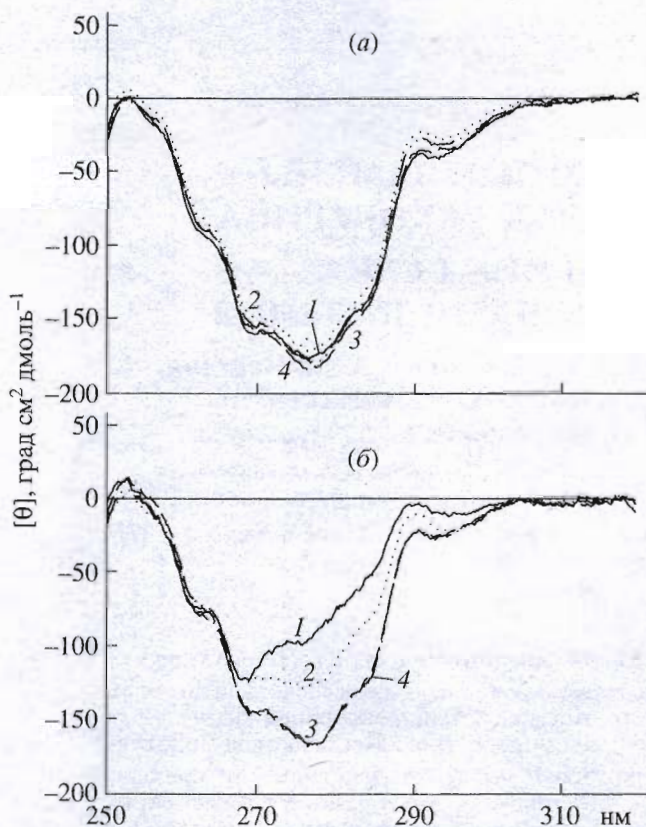


Рис. 1. Спектры КД рековерина и его мутантов в ближней УФ-области: (а) – в отсутствие Ca^{2+} (1 мМ EGTA) и (б) – в его присутствии (1 мМ CaCl_2). Измерения спектров *wt*-рековерина (1) и мутантов $-\text{EF}2$ (2), $-\text{EF}3$ (3) и $-\text{EF}2,3$ (4) проводили в 50 мМ H_3BO_3 – KOH -буфере, рН 8.06, при 15°C; концентрация белка 0.64 мг/мл.

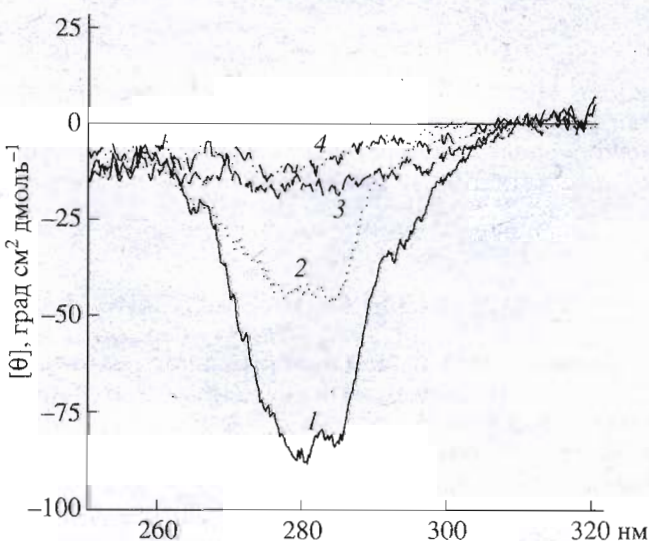
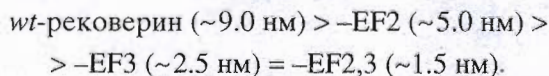


Рис. 2. Разностные спектры КД рековерина и его мутантов в ближней УФ-области. Спектры получены путем вычитания спектров Ca^{2+} -содержащих форм из соответствующих спектров апо-форм *wt*-рековерина (1) и мутантов $-\text{EF}2$ (2), $-\text{EF}3$ (3) и $-\text{EF}2,3$ (4).

исследованные белки можно расположить в следующей последовательности:



Принято считать, что красный сдвиг максимума собственной флуоресценции белка объясняется увеличением доступности его остатков триптофана для растворителя и/или увеличением лабильности их микроокружения. Таким образом, связывание ионов кальция рековерином оказывает существенное воздействие на окружение остатков триптофана в его молекуле, делая это окружение более подвижным. Такая особенность резко отличает рековерин от других Ca^{2+} -связывающих белков (в частности, от парвальбумина, α -лактальбумина [2, 3]), для которых показано, что связывание Ca^{2+} сдвигает их спектр триптофановой флуоресценции в коротковолновую сторону.

Спектры КД в ближней УФ-области. Известно, что выраженный спектр КД белка в ближней УФ-области определяется наличием асимметрии в окружении ароматических аминокислотных остатков и, таким образом, является свидетельством существования жесткой третичной структуры в белковой молекуле.

Спектры КД *wt*-рековерина и его мутантов $-\text{EF}2$, $-\text{EF}3$ и $-\text{EF}2,3$ в ближней УФ-области, измеренные в отсутствие Ca^{2+} практически полностью совпадают (рис. 1а). Следовательно, точечные аминокислотные замены во 2-м и 3-м центрах существенно не изменяют третичную структуру молекулы апорековерина.

Выше отмечалась необычная особенность молекулы рековерина, состоящая в заметном сдвиге спектра флуоресценции белка в длинноволновую сторону при связывании ионов кальция. Такое поведение может быть обусловлено увеличением доступности остатков триптофана белковой молекулы для растворителя. Очевидно, что наличие внутримолекулярной перестройки такого рода может привести к изменению спектров КД в ближней УФ-области.

Сравнение спектров КД рековерина и его мутантов в ароматической области, измеренных в присутствии Ca^{2+} (рис. 1б) со спектрами, приведенными на рис. 1а, показывает, что взаимодействие с Ca^{2+} действительно вызывает значительное изменение формы и амплитуды спектра КД белков.

Соответствующие разностные спектры КД наглядно иллюстрируют индуцируемые ионами кальция спектральные изменения для *wt*-рековерина и его мутантов (рис. 2). Видно, что эти спектры имеют максимальную интенсивность при длинах волн ~ 280 нм, т.е. именно там, где потенциальный вклад остатков триптофана максимален. В то же время из анализа рис. 1 и 2 следует,

что взаимодействие с ионами кальция, по-видимому, не сказывается на окружении других ароматических аминокислотных остатков (Tyr и Phe) в молекуле исследуемых форм рековерина.

Полученные данные по влиянию ионов кальция на спектры КД в ближней УФ-области показывают, что взаимодействие с Ca^{2+} сопровождается уменьшением степени асимметрии окружения остатков триптофана в молекуле рековерина. Следует отметить, что такое Ca^{2+} -индуцируемое структурное изменение является весьма необычным. Поскольку жесткость окружения других ароматических остатков остается практически неизменной, то мы вправе предположить, что наблюдаемые спектральные изменения скорее всего свидетельствуют об увеличении доступности для растворителя только остатков триптофана. В пользу этой гипотезы свидетельствует также тот факт, что связывание ионов кальция рековерином вызывает сдвиг спектра его триптофановой флуоресценции в длинноволновую сторону, что опять же довольно необычно для Ca^{2+} -связывающих белков. Рассмотрение данных ЯМР по третичной структуре рековерина в апо- и Ca^{2+} -содержащей формах [4, 5] показывает, что и красный спектральный сдвиг, и уменьшение сигнала КД в ароматической области, по-видимому, обусловлены Ca^{2+} -индуцируемым перемещением остатков Trp-103 и Trp-155 из внутренней части белковой глобулы на ее поверхность. Это согласуется с тем, что эффективность тушения триптофановой флуоресценции миристилированной формы рековерина акриламидом возрастает при насыщении белка кальцием [6].

Спектры КД рековерина и его мутантов в дальней УФ-области. Спектр КД белка в дальней УФ-области отражает степень симметричности окружения пептидных связей и позволяет характеризовать вторичную структуру его молекулы.

Спектры КД в пептидной области, измеренные для рековерина и его мутантных форм в отсутствие ионов кальция (рис. 3а), свидетельствуют в пользу того, что вторичная структура апорековерина не изменяется при введении точечных аминокислотных замен в его 2-й и 3-й Ca^{2+} -связывающие центры. Следует также отметить, что в отличие от параметров, рассмотренных выше (рис. 1 и 2), спектр КД рековерина в пептидной области малочувствителен к взаимодействию белка с ионами кальция. Связывание Ca^{2+} рековерином и его мутантами сопровождается лишь незначительным увеличением интенсивности спектра (рис. 3б), отражающем слабое увеличение содержания α -спиральной структуры в молекуле белка, типичное для других Ca^{2+} -связывающих белков [7].

Взаимодействие рековерина и его мутантов с гидрофобным флуоресцирующим зондом ANS.

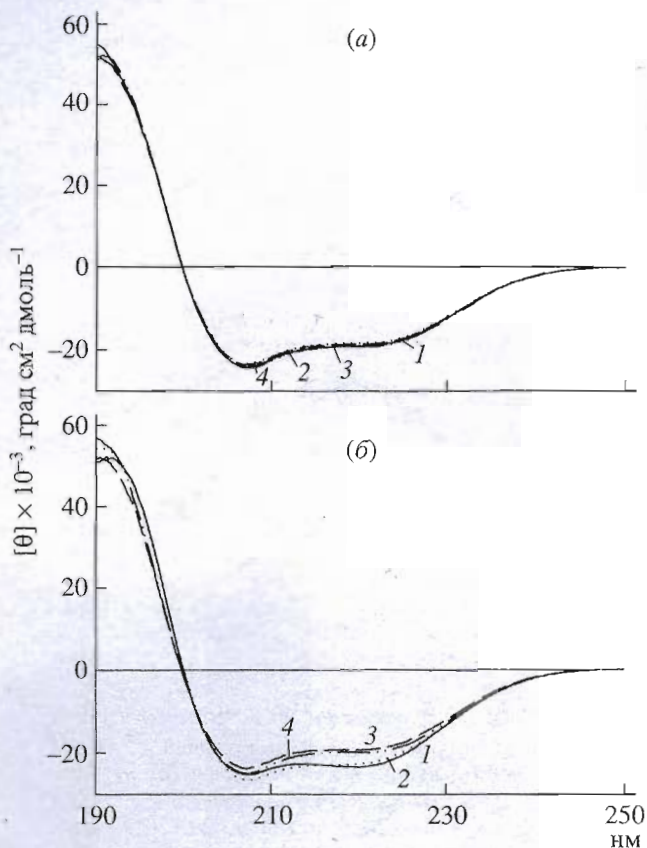


Рис. 3. Спектры КД рековерина (1) и его мутантов -EF2 (2), -EF3 (3) и -EF2,3 (4) в дальней УФ-области: (а) – в отсутствие Ca^{2+} (1 mM EGTA) и (б) – в его присутствии (1 mM CaCl_2). Условия измерения см. подпись к рис. 1.

Степень гидрофобности белковой молекулы можно оценить по ее сродству к флуоресцирующему зонду 8-анилино-1-нафталинсульфонату (ANS) [8]. Известно также, что наибольшим сродством к ANS белковая молекула обладает в состоянии типа расплавленной глобулы [9]. Взаимодействие белка с ANS легко регистрируется по характерному увеличению интенсивности флуоресценции зонда и синему сдвигу ее максимума [8, 9].

Спектры флуоресценции ANS, измеренные в растворах, которые содержат *wt*-рековерин и его мутанты показывают, что в отсутствие ионов кальция (рис. 4, кривые 1–5) ни одна из форм рековерина не взаимодействует с ANS. Аналогичная картина наблюдается для мутантов -EF3 и -EF2,3 и в 1 mM CaCl_2 (рис. 4, кривые 8, 9). Ca^{2+} -содержащие формы *wt*-рековерина и мутанта -EF2 способны эффективно связывать ANS, при этом наибольшим сродством к зонду обладает Ca^{2+} -содержащий *wt*-рековерин (рис. 4, кривые 6, 7). Данное наблюдение находится в хорошем соответствии с полученными ранее результатами, свидетельствующими о том, что взаимодействие с

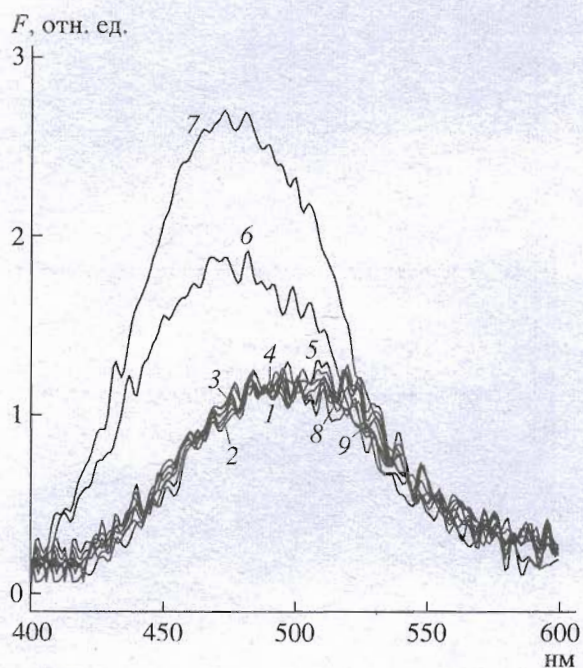


Рис. 4. Спектры флуоресценции ANS в присутствии рековерина и его мутантов. В отсутствие Ca^{2+} (1 mM EGTA): свободный ANS (1), *wt*-рековерин (2), мутанты -EF2 (3), -EF3 (4) и -EF2,3 (5); в присутствии Ca^{2+} (1 mM CaCl_2): *wt*-рековерин (6), мутанты -EF2 (7), -EF3 (8) и -EF2,3 (9). 50 mM H_3BO_3 - КОН-буфер, pH 8.06; 15°C; концентрация белка 0.01 мг/мл, молярное соотношение ANS/белок равно 10. Возбуждение при 350 нм.

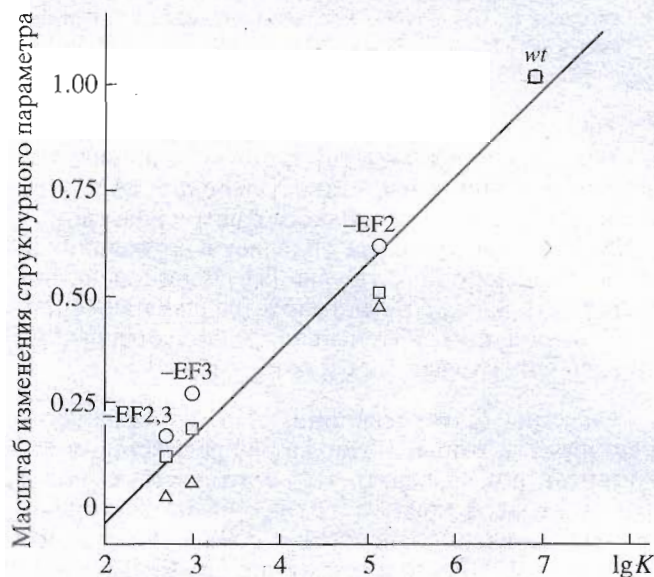


Рис. 5. Зависимость масштаба Ca^{2+} -индуцируемых структурных изменений в рековерине и его мутантах от их сродства к ионам кальция. (○) - длинноволновый сдвиг максимума собственной флуоресценции; (□) - уменьшение интенсивности спектра КД в ближней УФ-области, $[\theta]_{280}$; (△) - увеличение интенсивности флуоресценции ANS. Каждый параметр нормирован на величину, характерную для *wt*-рековерина.

Ca^{2+} индуцирует экспонирование гидрофобных ANS-связывающих участков на поверхности молекул миристоилированного и немиристоилированного рековерина [6].

Таким образом, при взаимодействии с ионами кальция молекула рековерина претерпевает ряд существенных конформационных перестроек, в результате которых ее поверхность делается более гидрофобной и заметно увеличивается подвижность окружения присутствующих в ней триптофановых остатков, тогда как окружение других ароматических аминокислотных остатков практически не изменяется. При этом происходит некоторое увеличение содержания α -спиралей в белковой молекуле и некоторое уменьшение ее гидродинамических размеров [6].

Зависимость степени Ca^{2+} -индуцируемого изменения структурных параметров исследованных форм рековерина от десятичного логарифма соответствующей константы связывания ионов кальция (рис. 5) наглядно иллюстрирует интересную особенность *wt*-рековерина и его мутантных форм, состоящую в том, что масштаб структурных изменений в белковой молекуле прямо пропорционален ее способности связывать ионы кальция. Дополнительное подтверждение правильности данного вывода было получено при исследовании тепловой денатурации рековеринов.

Тепловая денатурация рековерина и его мутантов. Наблюдаемый длинноволновый сдвиг спектра флуоресценции *wt*-рековерина и его мутантов в присутствии и в отсутствие ионов кальция, индуцируемый повышением температуры (рис. 6), означает разворачивание молекулы белка, делающее остатки триптофана в ней более доступными растворителю.

В апо-состоянии *wt*-рековерин и его мутанты плавятся весьма сходно (рис. 6а). Различие в положении полуперехода у различных форм рековерина составляет не более 8–10°C, причем мутанты даже более термостабильны, чем белок дикого типа, для которого кооперативность плавления также несколько ниже, чем у мутантов. Таким образом, данные по температурной зависимости флуоресценции различных апо-форм рековерина говорят об удачности мутаций, введение которых в его молекулу не повлияло существенно на стабильность белковой глобулы.

Рассмотрение результатов тепловой денатурации Ca^{2+} -содержащих форм рековерина (рис. 6б), показывает, что по поведению при низких температурах все исследованные формы можно подразделить на две группы, различающиеся по положению максимума флуоресценции. Первая группа, включающая *wt*-рековерин и мутант -EF2, обладает самым длинноволновым спектром флуоресценции. Во вторую группу, обладающую заметно более коротковолновым спектром

флуоресценции, входят мутанты –EF3 и –EF2,3. При этом различия в серединах тепловых переходов наблюдаются лишь для второй группы, в которую входят наименее термостабильные формы рековерина.

Сравнивая данные по тепловой денатурации апо- и Ca^{2+} -содержащих форм рековерина, следует отметить, что лишь для мутанта –EF3 связывание ионов кальция приводило к некоторому уменьшению термостабильности белковой молекулы, что нетипично для Ca^{2+} -связывающих белков. Для *wt*-рековерина и мутанта –EF2 Ca^{2+} -индуцируемый сдвиг теплового перехода составил соответственно 15 и 11°C (рис. 6б, 1, 2), в то время как для мутанта –EF2,3 ион кальция не вызывал существенных изменений в положении теплового перехода (кривая 4). Такое незначительное увеличение термостабильности при связывании ионов кальция необычно мало по сравнению с другими Ca^{2+} -связывающими белками (более 50–60°C для парвальбуминов и более 30°C для α -лактальбумина [10]). Отсюда следует, что вклад связывания ионов кальция в стабилизацию структуры белковой глобулы в случае рековерина меньше, чем у других Ca^{2+} -связывающих белков; более того, связывание Ca^{2+} мутантом –EF3 приводит даже к дестабилизации молекулы белка. Аналогичное поведение, являясь нетипичным, ранее уже наблюдалось для ряда металлсвязывающих белков и объяснялось большим сродством к иону металла белковой молекулы в денатурированном состоянии [11–13]. Интересно также то, что мутация в 3-м Ca^{2+} -связывающем центре рековерина, приводящая к полной потере у него высокого сродства к ионам кальция, не вызывает разрушения кооперативной структуры белка, который плавится примерно при тех же температурах, что и апо-рековерин дикого типа.

Результаты настоящей работы свидетельствуют о необычном изменении структурных свойств молекулы рековерина при его взаимодействии с ионами кальция. Действительно, наряду с хорошо известными для других металлсвязывающих белков структурными изменениями, обусловленными переходом в холо-форму (как то: некоторое уменьшение гидродинамических размеров, увеличение содержания α -спиралей и возрастание конформационной стабильности), холорековерин характеризуется такими уникальными характеристиками, как возросшая гидрофобность и высокая доступность триптофановых остатков белка для растворителя. На первый взгляд, здесь имеет место явное противоречие, поскольку для обычного белка достаточно трудно представить ситуацию, в которой уменьшение размеров и явное структурирование белковой молекулы сопровождалось бы возрастанием ее гидрофобности и переходом триптофановых остатков из внутреннего пространства белковой глобулы на поверхность. Такое

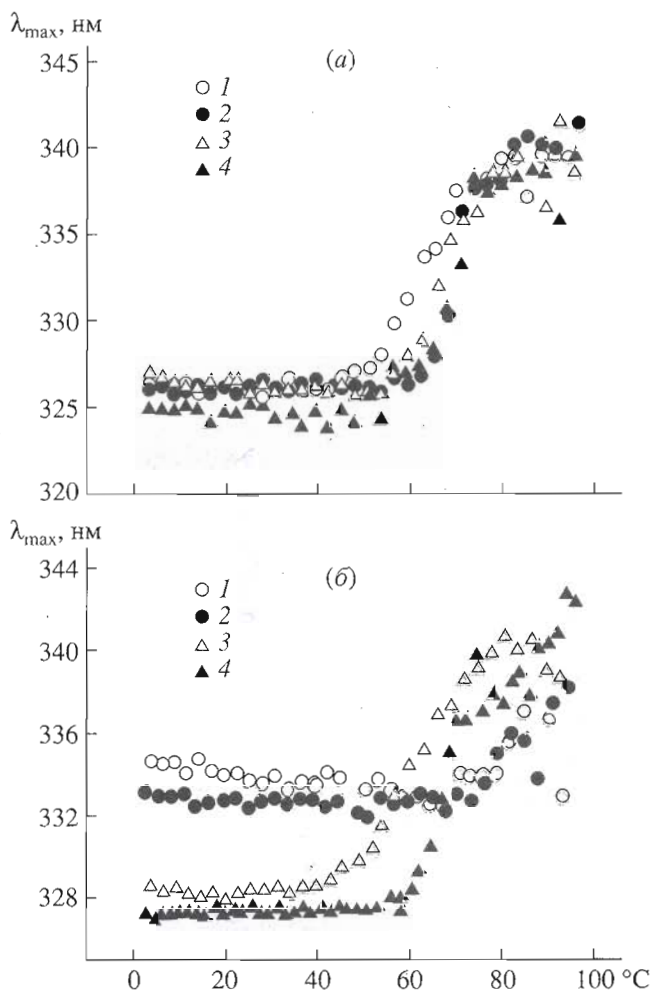


Рис. 6. Температурная зависимость положения максимума спектра флуоресценции для рековерина и его мутантов: (а) – в отсутствие Ca^{2+} (1 мМ EGTA) и (б) – в его присутствии (1 мМ CaCl_2). *wt*-рековерин (1), мутанты –EF2 (2), –EF3 (3) и –EF2,3 (4). 10 мМ HEPES-KOH, pH 8.0. Возбуждение при 280.4 нм.

необычное поведение рековерина, возможно, связано с его функцией в фоторецепторной клетке.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение препаратов, оборудование и экспериментальные процедуры описаны в предыдущей работе данной серии [1].

В работе использовали ANS (Sigma, США).

Спектры КД в ближней и дальней УФ-областях измеряли в кюветах с длиной оптического пути соответственно 5 и 0.19 мм с помощью спектрополяриметра Jasco-600 (Japan Spectroscopic Co.). Измерения проводили в 50 мМ H_2BO_3 – KOH-буфере, pH 8.06, при 15°C и концентрации белка – 0.64 мг/мл.

Температурные зависимости собственной флуоресценции белка анализировали по методу, предложенному Пермяковым и Бурштейном [14].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Э.А. Бурштейну за предоставленную возможность проведения измерений на спектрофлуориметре и Д.Б. Вепринцеву за компьютеризацию использованного в работе спектрофлуориметра. Работа частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 98-04-49211, 97-04-49145, 94-04-1167, 98-04-49293) и фондом Wellcome Trust (ИИС и ППФ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пермяков С.Е., Сенин И.И., Уверский В.Н., Черская А.М., Шульга-Морской С.В., Зинченко Д.В., Алексеев А.М., Заргаров А.А., Липкин В.М., Филиппов П.П., Пермяков Е.А. // Биоорг. химия. 1999. Т. 25. С. 742–746.
2. Permyakov E.A., Yarmolenko V.V., Emelyanenko V.I., Burstein E.A., Gerday C., Closset J. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 109. P. 307–315.
3. Permyakov E.A., Yarmolenko V.V., Kalinichenko L.P., Morozova L.A., Burstein E.A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1981. V. 100. P. 191–197.
4. Ames J.B., Ishima R., Tanaka T., Gordon J.I., Stryer L., Ikura M. // Nature. 1997. V. 389. P. 198–202.
5. Tanaka T., Ames J.B., Harvey T.S., Stryer L., Ikura M. // Nature. 1995. V. 376. P. 444.
6. Hughes R.E., Brzovic P.S., Klevit R.E., Hurley J.B. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 11410–11416.
7. Kataoka M., Mihara K., Tokunaga F. // J. Biochem. 1993. V. 114. P. 535–540.
8. Stryer L. // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. P. 482–495.
9. Semisotnov G.V., Rodionova N.V., Razgulyaev O.I., Uversky V.N., Gripas A.F., Gilmanshin R.I. // Biopolymers. 1991. V. 31. P. 119–128.
10. Пермяков Е.А. // Кальцийсвязывающие белки. М.: Наука, 1993.
11. Permyakov E.A., Shnyrov V.L., Kalinichenko L.P., Kuchara A., Reyzer I.L., Berliner L.J. // J. Prot. Chem. 1991. V. 10. P. 577–584.
12. Leontiev V.V., Uversky V.N., Permyakov E.A., Murzin A.G. // Biochim. Biophys. Acta. 1993. V. 1162. P. 84–88.
13. Garnier C., Protasevich I., Gilli R., Tsvetkov F., Lobachov V., Peyrot V., Briand C., Makarov A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998. V. 249. P. 197–201.
14. Permyakov E.A., Burstein E.A. // Biophys. Chem. 1984. V. 19. P. 265–271.

Point Amino Acid Substitutions in the Ca²⁺-Binding Sites of Recoverin. II. The Unusual Behavior of the Protein upon the Binding of Calcium Ions

V. N. Uversky*, S. E. Permyakov*, I. I. Senin**, A. M. Cherskaya*,
S. V. Shulga-Morskoy***, D. V. Zinchenko***, A. M. Alekseev***,
A. A. Zargarov***, V. M. Lipkin***, P. P. Philippov**, and E. A. Permyakov*#

*Institute for Biological Instrument Making, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

**Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

***Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino Branch,
Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

The structural properties of myristoylated forms of recombinant recoverin of the wild type and of its mutants with damaged second and/or third Ca²⁺-binding sites were studied by fluorimetry and circular dichroism. The interaction of wild-type recoverin with calcium ions was shown to induce unusual structural rearrangements in its molecule. In particular, protein binding with Ca²⁺ ions results in an increase in the mobility of the environment of Trp residues, in higher hydrophobicity, and in elevated thermal stability (its thermal transition shifts by 15°C to higher temperatures) but has almost no effect on its secondary structure. Similar structural changes induced by Ca²⁺ are also characteristic of the –EF2 mutant of recoverin whose second Ca²⁺-binding site is modified and cannot bind calcium ions. The structural properties of the –EF3 and –EF2,3 mutants (whose third or simultaneously second and third Ca²⁺-binding sites, respectively, are modified and damaged) are practically indifferent to calcium ions.

Key words: photoreception, calcium-binding proteins, recoverin, site-directed mutagenesis, fluorescence, circular dichroism

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 924-5749; fax: +7 (827) 79-0522;
e-mail: permyakov@ibp.serpukhov.su.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 3. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.