



УДК 577.354.2

ТОЧЕЧНЫЕ АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ В Ca^{2+} -СВЯЗЫВАЮЩИХ ЦЕНТРАХ РЕКОВЕРИНА. III. МУТАНТ С ЧЕТВЕРТЫМ РЕКОНСТРУИРОВАННЫМ Ca^{2+} -СВЯЗЫВАЮЩИМ ЦЕНТРОМ

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

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

* НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, 119899, Москва;

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

Поступила в редакцию 11.03.99 г. Принята к печати 13.05.99 г.

В отличие от рековерина дикого типа, в котором из четырех потенциальных Ca^{2+} -связывающих центров работают только два (2-й и 3-й), мутант +EF4 содержит еще один активный Ca^{2+} -связывающий центр, реконструированный из 4-го потенциального Ca^{2+} -связывающего домена путем введения в него аминокислотных замен с помощью сайт-направленного мутагенеза. Методами собственной флуоресценции и кругового дихроизма исследовано влияние замен в 4-м потенциальном Ca^{2+} -связывающем центре миристоиллированного рековерина на структурные характеристики и конформационную стабильность этого белка. Показано, что свободная от ионов Ca^{2+} форма (апо-форма) полученного мутанта обладает более высокой кальциевой емкостью, существенно меньшей термостабильностью и заметно отличными вторичной и третичной структурами по сравнению с апо-формой рековерина дикого типа.

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

Рековерин – это сравнительно небольшой Ca^{2+} -связывающий белок ($M \approx 23$ кДа), примечательная особенность которого заключается в присутствии в его молекуле четырех потенциальных центров связывания ионов кальция. Из них только два – 2-й и 3-й – имеют каноническую аминокислотную последовательность и пространственную структуру, присущую Ca^{2+} -связывающему мотиву, типа “EF-hand”, и действительно способны связывать ионы кальция. В то же время 1-й и 4-й центры являются Ca^{2+} -связывающими лишь потенциально: они хотя и близки по своей пространственной структуре каноническому EF-hand-домену, но по первичной структуре существенно отличаются от него; при этом 1-й потенциальный Ca^{2+} -связывающий центр EF1 “возмущен” гораздо сильнее 4-го центра.

В первых двух работах этой серии мы исследовали взаимодействие ионов кальция с миристои-

лированными формами рековерина дикого типа (*wt*-рековерина) и его мутантов с “испорченными” 2-м и(или) 3-м Ca^{2+} -связывающими центрами путем измерения собственной флуоресценции и КД-спектров указанных белков [1, 2]. В настоящей работе поставлена задача сравнить Ca^{2+} -связывающие свойства, структурные характеристики и конформационную стабильность *wt*-рековерина и его мутанта, обозначенного нами как +EF4. Этот мутант, содержащий в отличие от *wt*-рековерина три работающих Ca^{2+} -связывающих центра (два природных и один искусственный, реконструированный из 4-го потенциального Ca^{2+} -связывающего домена), был получен в результате одновременного введения пяти замен (Gly160Asp, Lys161Glu, Lys162Asn, Asp165Gly и Lys166Gln) в 4-й EF-hand-домен миристоиллированного рековерина [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структурные свойства мутанта +EF4. На рис. 1а приведены спектры КД в ближней УФ-области, измеренные для апо-(свободной от Ca^{2+}) и холо-

Сообщение II см. [1].

Сокращения: *wt*-рековерин – рекомбинантный миристоиллированный рековерин дикого типа.

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

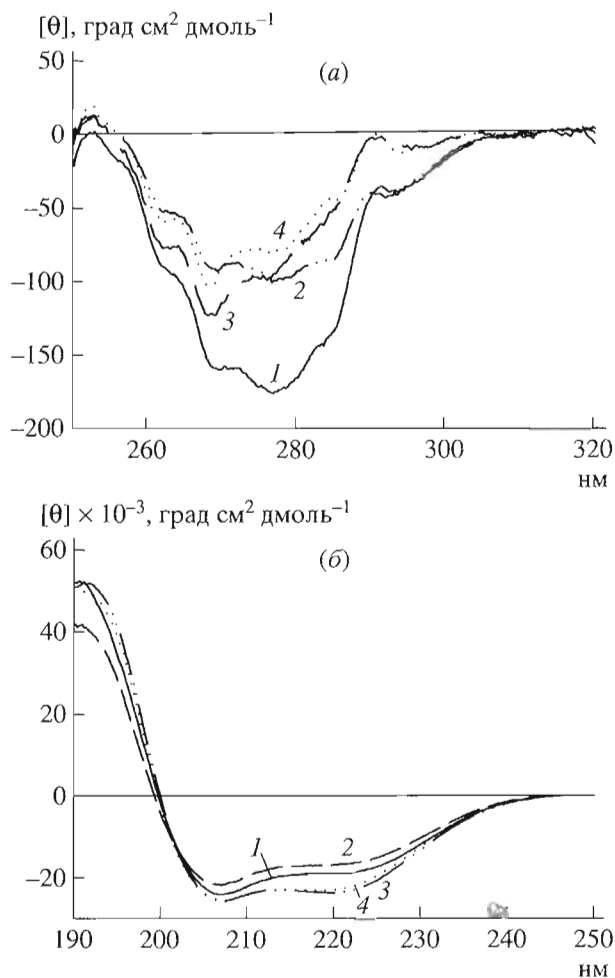


Рис. 1. Спектры КД *wt*-рековерина (1, 3) и его мутанта +EF4 (2, 4) в ближней (а) и дальней (б) УФ-областях в отсутствие Ca^{2+} (1 мМ EGTA) (1, 2) и в присутствии Ca^{2+} (1 мМ CaCl_2) (3, 4). Измерения проводили в 50 мМ H_3BO_3 , pH 8.06, 15°C; концентрация белка в пробах 0.64 мг/мл.

(Ca^{2+} -содержащей) форм *wt*-рековерина и его мутанта +EF4. Видно, что в отсутствие ионов кальция интенсивность спектра у мутанта +EF4 существенно ниже, чем у *wt*-рековерина. Этот факт свидетельствует о том, что в молекуле +EF4 по сравнению с *wt*-рековерином существенно нарушена жесткость окружения ароматических аминокислотных остатков. Следует также отметить, что апо-форма +EF4 имеет более длинноволновый спектр флуоресценции, чем *wt*-рековерин (λ_{max} равны соответственно 334 и 327 нм) (см. ниже, рис. 3а), что свидетельствует о более высокой доступности остатков триптофана растворителю в молекуле мутанта. Рис. 1б, на котором приведены КД-спектры *wt*-рековерина и +EF4 в дальней УФ-области, дает дополнительное подтверждение правильности вывода о деструктурирующем воздействии на рековерин введения замен в 4-й

Ca^{2+} -связывающий центр. Из рисунка видно, что мутации в этом центре индуцируют изменение формы и амплитуды спектра КД апо-белка в ближней УФ-области, что свидетельствует о заметном возмущении вторичной структуры белковой молекулы.

Следует отметить, что наблюдаемое дестабилизирующее воздействие мутаций в 4-м Ca^{2+} -связывающем центре рековерина, по-видимому, не сопровождается денатурацией его молекулы, которая сохраняет относительно жесткую структуру. Этот вывод подтверждается данными, представленными на рис. 2, который демонстрирует влияние *wt*-рековерина и мутанта +EF4 на флуоресценцию ANS (8-анилино-1-нафталинсульфонат). Видно, что в присутствии ионов кальция обе формы рековерина значительно увеличивают интенсивность флуоресценции ANS, что говорит об их способности связывать флуоресцентный зонд. В то же время в отсутствие ионов кальция, когда *wt*-рековерин и +EF4 находятся в апо-форме, спектр ANS не чувствителен к добавлению белков. Этот факт указывает на отсутствие связывания с ними ANS, что характерно для большинства нативных белков с жесткой третичной структурой.

На рис. 3 приведены температурные зависимости положения максимума спектра флуоресценции *wt*-рековерина и мутанта +EF4 в отсутствие (а) и в присутствии (б) ионов кальция. Видно, что увеличение температуры сопровождается существенным длинноволновым сдвигом максимума спектра у обеих форм рековерина, что говорит о разворачивании белковой молекулы, в ходе которого остатки триптофана становятся более доступными растворителю. В обоих случаях зависимости могут быть описаны сигмоидальной кривой, что свидетельствует о кооперативном характере разрушения пространственной структуры молекул белков. Из рисунка также следует, что апо-форма +EF4, обладающая при низких температурах более длинноволновым спектром флуоресценции, чем апо-форма *wt*-рековерина, гораздо менее термостабильна по сравнению с ним.

Таким образом, можно сделать вывод, что аминокислотные замены в 4-м потенциальном Ca^{2+} -связывающем центре, введенные с целью придания ему способности связывать ионы кальция, воздействуют также на структурные свойства молекулы рековерина. Апо-форма мутанта +EF4 характеризуется заметным возмущением как вторичной, так и третичной структуры, а также заметным уменьшением термостабильности по сравнению с *wt*-рековерином. Тем не менее мутантный белок, видимо, все же сохраняет жесткую пространственную структуру.

Влияние ионов кальция на структуру мутанта +EF4. Вопрос о влиянии ионов кальция на струк-

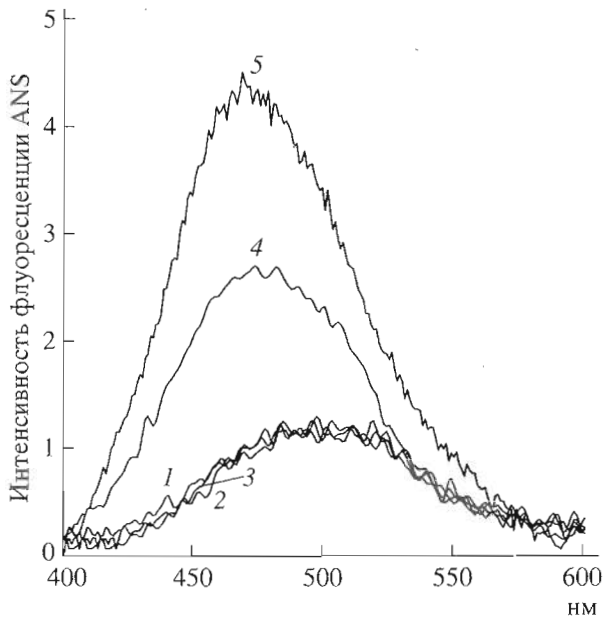


Рис. 2. Влияние *wt*-рековерина и его мутанта +EF4 на спектр флуоресценции ANS в отсутствие (1–3) и в присутствии (4, 5) Ca^{2+} . 1 – свободный ANS, 2 – (*wt*-рековерин + ANS), 3 – (+EF4 + ANS), 4 – (*wt*-рековерин + ANS + Ca^{2+}), 5 – (+EF4 + ANS + Ca^{2+}). Исследования проводили в 50 мМ H_3BO_3 , pH 8.06, содержащей 1 мМ EGTA (пробы без Ca^{2+}) или 1 мМ CaCl_2 (пробы с Ca^{2+}), при 15°C; концентрация белка 0.01 мг/мл, молярное соотношение ANS/рековерин равно 10. Возбуждение при 350 нм.

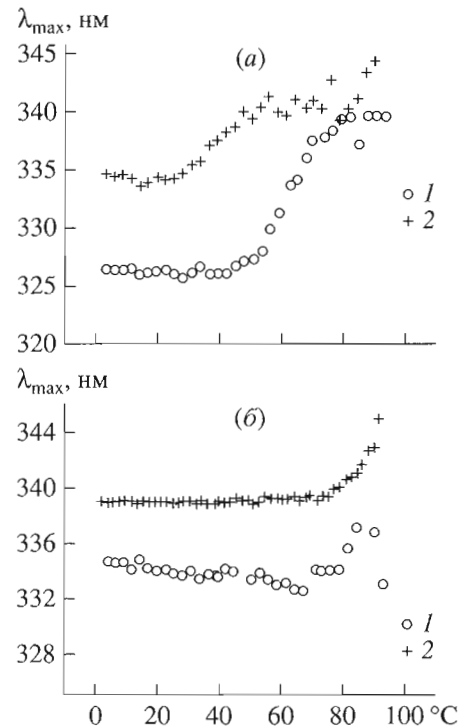


Рис. 3. Температурная зависимость положения максимума спектра флуоресценции для *wt*-рековерина (1) и мутанта +EF4 (2). Измерения проводили в 10 мМ HEPES-KOH-буфере, pH 8.0, (а) в отсутствие (1 мМ EGTA) или (б) в присутствии (1 мМ CaCl_2) Ca^{2+} . Возбуждение при 280.4 нм.

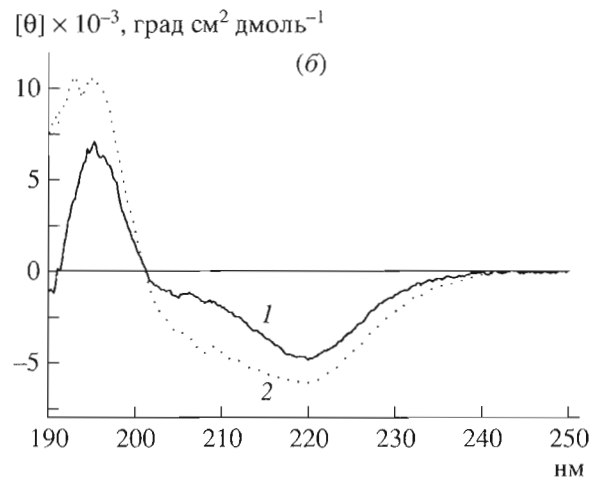
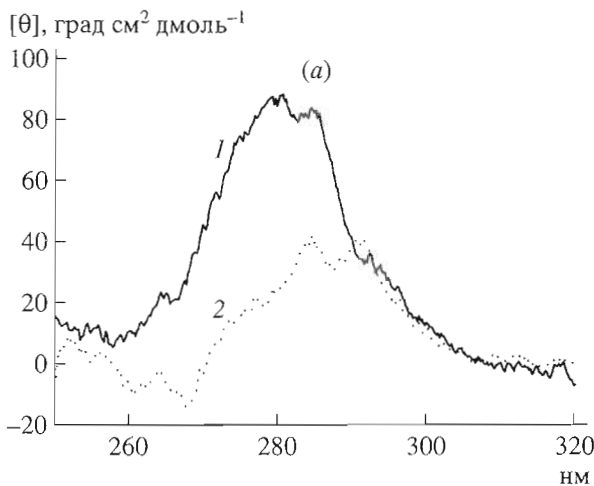


Рис. 4. Разностные спектры КД в ближней (а) и дальней (б) УФ-областях, полученные путем вычитания спектров апоформ *wt*-рековерина (1) и мутанта +EF4 (2) из спектров соответствующих холо-форм.

турные свойства *wt*-рековерина и его мутантов с заменами во 2-м и 3-м Ca^{2+} -связывающих центрах подробно рассмотрен в предыдущей работе этой серии [1]. Так, было показано, что при высоко-специфическом связывании ионов кальция с рековерином уменьшается степень асимметрии ок-

ружения триптофановых остатков в молекуле белка и увеличивается доступность этих остатков растворителю, кроме того, возрастает гидрофобность белковой молекулы, в ней повышается содержание α -спиральной структуры и заметно увеличивается ее термостабильность.

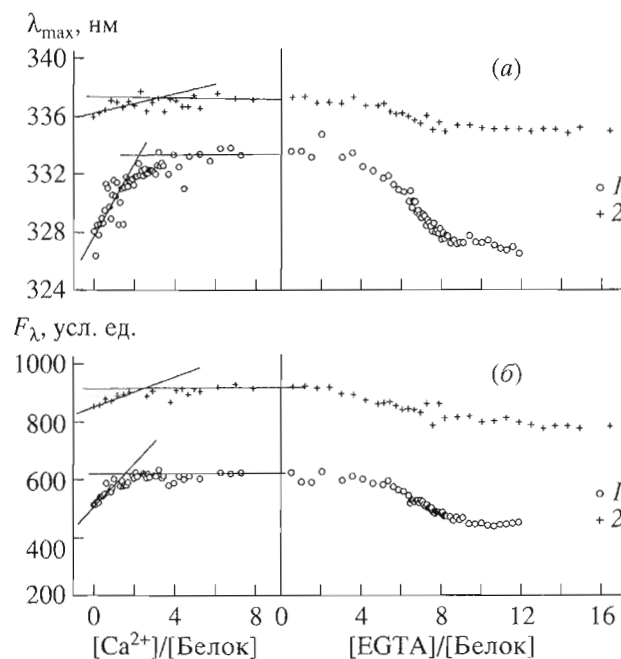


Рис. 5. Спектрофлуориметрическое титрование *wt*-рековерина (1) и мутанта +EF4 (2) ионами кальция и EGTA. (а) – положение максимума спектра флуоресценции; (б) – интенсивность флуоресценции при 350–366 нм. Измерения проводили в 10 мМ НЕРЕС-КОН-буфере, рН 8.1, при 14°C; концентрация белка 0.05 мг/мл.

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что все перечисленные структурные изменения при связывании ионов кальция характерны и для мутанта +EF4.

Так, из рис. 1 следует, что при добавлении ионов кальция КД-спектры мутанта +EF4 претерпевают существенные изменения: интенсивность спектра в ближней УФ-области заметно уменьшается, а в дальней УФ-области наоборот возрастает. При этом холо-формы *wt*-рековерина и +EF4 характеризуются весьма близкими спектральными характеристиками.

На рис. 4 представлены разностные спектры КД в ближней (а) и дальней (б) УФ-областях для *wt*-рековерина и мутанта +EF4. Характер спектров в ближней УФ-области свидетельствует о том, что при связывании ионов кальция у обоих белков меняется, в основном, окружение остатков триптофана в их молекулах. Разностные КД-спектры в дальней УФ-области по форме близки к спектру α -спирали, поэтому можно предположить, что связывание ионов кальция сопровождается также некоторым увеличением содержания именно этого элемента вторичной структуры.

В присутствии ионов кальция сродство мутанта +EF4 к ANS существенно выше, чем у *wt*-рековерина (рис. 2). Ионы кальция в высокой концентрации (1 мМ $CaCl_2$) вызывают при низких темпе-

ратурах сильный сдвиг спектров флуоресценции у обеих форм рековерина, который составляет 9 нм в случае *wt*-рековерина и 4 нм для мутанта +EF4 (рис. 3). Следует также отметить, что связывание ионов кальция сопровождается возрастанием термостабильности мутанта +EF4 не менее чем на 45°C, тогда как величина сдвига теплового перехода у *wt*-рековерина составляет всего 15°C.

Оценка сродства мутанта +EF4 к кальцию. В первой работе этой серии [2], используя метод спектрофлуориметрического титрования, мы продемонстрировали последовательное взаимодействие ионов кальция с двумя Ca^{2+} -связывающими центрами рековерина: оказалось, что заполнение 2-го центра катионом возможно только после заполнения 3-го центра белка. Измерение констант связывания ионов кальция с рековерином дало значения 3.7×10^6 и $3.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ соответственно для 3-го и 2-го Ca^{2+} -связывающих центров.

Результаты настоящей работы, приведенные выше, подтверждают, что мутант +EF4 с реконструированным 4-м потенциальным Ca^{2+} -связывающим центром также способен специфически связывать ионы кальция. Однако малая амплитуда Ca^{2+} -индуцируемых спектральных эффектов, выявленных в случае +EF4, не позволяет провести количественное исследование этого связывания. Тем не менее из кривых титрования +EF4 ионами кальция следует, что этот мутант связывает катион с довольно сильным сродством и что выход на плато достигается при молярном соотношении $Ca^{2+}/\text{белок}$ около 3; т.е. кальциевая емкость +EF4, как и следовало ожидать, выше, чем у *wt*-рековерина (рис. 5).

Поскольку ранее нами установлена корреляция между сродством рековерина к ионам кальция и степенью вызываемых ими структурных изменений в его молекуле, мы попытались оценить максимальную эффективную константу, характеризующую связывание Ca^{2+} с мутантом +EF4, на основании данных предыдущей [1] и настоящей (рис. 5) работ по Ca^{2+} -индуцированным спектральным изменениям рековерина.

Прямая, описывающая зависимость структурных изменений от логарифма константы связывания (рис. 5 в работе [1]), задается соотношением $f = -0.44 + 0.2 \lg K$. Принимая, что для Ca^{2+} -индуцируемых спектральных изменений в +EF4 f лежит в диапазоне 1.0–1.5, получаем возможный интервал величин эффективной константы связывания 10^6 – 10^9 M^{-1} .

Таким образом, на основании полученных в настоящей работе данных можно сделать вывод о том, что мутации в 4-м потенциальном Ca^{2+} -связывающем центре рековерина, придающие ему способность связывать ионы кальция, весьма значительно влияют на общую стабильность белковой глобулы, сдвигая тепловой переход для апо-

формы мутанта на 25°C в сторону более низких температур, приводя к существенным изменениям его спектров КД в ближней и дальней УФ-областях. Тем не менее, этот мутант рековерина с реконструированным Ca²⁺-связывающим центром обладает способностью связывать ионы кальция с высоким сродством (ориентировочно константы связывания находятся в диапазоне 10⁶–10⁹ М⁻¹) и имеет более высокую кальциевую емкость, чем рековерин дикого типа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использованные материалы, оборудование и экспериментальные процедуры описаны в работе [3] и предыдущих работах этой серии [1, 2].

Авторы благодарны Э.А. Бурштейну за предоставленную возможность проведения измерений на спектрофлуориметре и Д.Б. Вепринцеву за компьютеризацию использованного в работе спектрофлуориметра. Работа частично поддер-

жана 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. Уверский В.Н., Пермяков С.Е., Сенин И.И., 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. // *Биоорганическая химия*. 2000. Т. 26. С. 173–178.
2. 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. // *Биоорганическая химия*. 1999. Т. 25. С. 742–746.
3. Alekseev A.M., Shulga-Morskoy S.V., Zinchenko D.V., Shulga-Morskaya S.A., Suchkov D.V., Vaganova S.A., Senin I.I., Zargarov A.A., Lipkin V.M., Akhtar M., Philippov P.P. // *FEBS Lett.* 1998. V. 440. P. 116–118.

Point Amino Acid Substitutions in the Ca²⁺-Binding Sites of Recoverin. III. A Mutant with the Fourth Reconstructed Ca²⁺-Binding Site

S. E. Permyakov*, V. N. Uversky*, A. M. Cherskaya*, S. V. Shulga-Morskoy***, D. V. Zinchenko***, A. M. Alekseev***, E. Yu. Zernyi**, A. A. Zargarov***, I. I. Senin**, 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*

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

Unlike wild type recoverin with only two (the second and the third) functioning Ca²⁺-binding sites out of four potential ones, the +EF4 mutant contains a third active Ca²⁺-binding site. This site was reconstructed from the fourth potential Ca²⁺-binding domain by the introduction of several amino acid substitutions in it by site-directed mutagenesis. The effect of these mutations in the fourth potential Ca²⁺-binding site of myristoylated recoverin on the structural features and conformational stability of the protein was studied by fluorimetry and circular dichroism. The apoform of the resulting mutant (free of Ca²⁺ ions) was shown to have a higher calcium capacity, significantly lower thermal stability, and noticeably different secondary and tertiary structures as compared with the apoform of wild type recoverin.

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. 4. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.