



УДК 547.962.04:543.422.23

ГЛОБУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА L11 ИЗ РИБОСОМ
ESCHERICHIA COLI В РАСТВОРЕ.
ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ ПРОТОННОГО МАГНИТНОГО
РЕЗОНАНСА

Бушуев В. Н., Ожон М. С.

*Институт биологической физики Академии наук СССР, г. Пущино
Московской области*

Гудков А. Т., Туманова Л. Г.

Институт белка Академии наук СССР, г. Пущино Московской области

Белок L11 из 50S субчастиц рибосом *E. coli* был исследован в растворе $^2\text{H}_2\text{O}$ методом ^1H -ЯМР на частоте 360 МГц. С помощью метода гомоядерного двойного резонанса проведено отнесение сигналов протонов боковых цепей ароматических остатков в спектре ^1H -ЯМР белка к типу остатка. Показано, что как фенилаланиновые, так и тирозиновые остатки белка пространственно сближены. Из совокупности данных следует, что молекула белка L11 в растворе, по крайней мере ее N-концевая часть с 1-го до 69-го аминокислотного остатка полипептидной цепи L11, имеет компактную глобулярную структуру.

Предлагаемая работа посвящена изучению третичной структуры белка L11 из 50S субчастиц рибосом *E. coli* в растворе. Этот белок играет важную роль в ассоциации рибосомных субчастиц [1] и непосредственно взаимодействует с 23S РНК [2]. Белок L11 состоит из 141 аминокислотного остатка и имеет молекулярный вес 14874 [3]. Он характеризуется высокой степенью спиральности (35–40%) [4]. Из гидродинамических данных и данных по малоугловому рассеянию рентгеновских лучей был сделан вывод о вытянутой форме белка L11 в растворе [5]; максимальная длина молекулы белка составляет около 15 нм [5]. Опыты по сканирующей микрокалориметрии свидетельствуют о наличии упорядоченной третичной структуры белка L11 [4, 6].

Мы предприняли исследование структуры этого белка в растворе методом протонного магнитного резонанса.

Структура спектра белка L11 является типичной для спектров ПМР компактных глобулярных белков [7] (рис. 1).

В области высокого поля (0–3,5 м.д.) спектр содержит плохо разрешенные широкие линии. Лучше разрешены сигналы протонов $\epsilon\text{-CH}_2$ групп аминокислотных остатков лизинов (2,99 м.д.). В районе химических сдвигов протонов метильных групп аполярных алифатических остатков содержится большое количество сигналов от протонов с аномально высоким экранированием (0–0,8 м.д.). Такие сигналы, как правило, обусловлены протонами метильных групп алифатических аминокислот, боковые группы которых находятся в непосредственной близости от плоскости колец ароматических остатков [8]. Кольцевой ток может вызывать смещение сигналов от протонов этих групп в область высокого поля до 2,0 м.д. от их характерного положения для белков, не имеющих компактной структуры [9, 10].

Следовательно, наличие в спектре белка L11 сигналов в аномально высоком поле свидетельствует о пространственной близости некоторых аполярных алифатических остатков и ароматических остатков, что позволяет предположить существование упорядоченной пространственной структуры белка L11 в растворе.

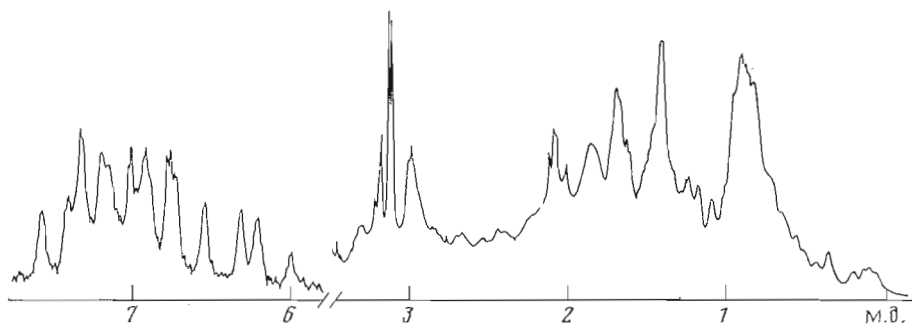


Рис. 1. Спектр ПМР белка L11

Идентификация сигналов от протонов боковых цепей ароматических остатков. В области спектра белка от 6,2 до 7,6 м.д. (рис. 1) находятся сигналы от протонов боковых групп четырех фенилаланиновых (37, 41, 66, 68) и двух тирозиновых остатков (7, 61), содержащихся в молекуле белка L11 [3]. Все сигналы уширены и практически не имеют разрешенной структуры. Использование метода улучшения разрешения в спектре [11] позволило для большинства сигналов выявить их мультиплетную структуру (рис. 2) и провести отнесение этих сигналов к типу ароматического остатка с помощью методов гомоядерного двойного резонанса и ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО).

Облучение дублетного сигнала при 7,02 м.д. интенсивностью в два протона с расщеплением 8 Гц (рис. 2а) приводит к тому, что дублетный сигнал при 6,77 м.д. сливается в синглетный. Структура остальных сигналов при этом не меняется. Следовательно, эти дублетные сигналы интенсивностью в два протона каждый являются спин-связанными и могут относиться только к кольцевым протонам одного и того же остатка тирозина (Tyr I). Поскольку сигналы от химически эквивалентных протонов при C3 и C5 кольца тирозина обычно находятся в более высоком поле, чем сигналы от протонов при C2 и C6 [12], дублет при 7,02 м.д. можно отнести к сигналу от протонов при C2 и C6, а дублет при 6,77 м.д. — к сигналу от протонов C3 и C5. Аналогично было выявлено, что два дублетных сигнала при 6,93 и 6,73 м.д. интенсивностью в два протона каждый и расщеплением 8 Гц также относятся к спин-связанным кольцевым протонам боковой цепи другого остатка тирозина (Tyr II), а именно к протонам при C2 и C6 и C3 и C5 соответственно.

Облучение триплетного сигнала при 7,55 м.д. интенсивностью в два протона приводит к тому, что дублетный сигнал такой же интенсивности при 7,20 м.д. сливается в синглетный, при этом также меняется структура плохо разрешенного сигнала при 7,16 м.д. (рис. 2б). При облучении сигнала при 7,16 м.д. (рис. 2в) триплетный сигнал при 7,55 м.д. становится дублетным. Таким образом, протоны, дающие сигналы при 7,55; 7,20 и 7,16 м.д., являются спин-связанными, что с учетом интенсивности и мультиплетности этих сигналов позволяет отнести их соответственно к протонам при C3 и C5, C2 и C6 и C4 кольца одного из остатков фенилаланина (Phe I).

Облучение триплетного сигнала интенсивностью в два протона при 7,39 м.д. вызывает изменение структуры сигнала интенсивностью в четыре протона при 7,32 м.д. (рис. 2е), а облучение небольшого сигнала при 6,98 м.д., так же как и сигнала при 7,32 м.д., приводит к тому, что триплетный сигнал при 7,39 м.д. становится дублетным (рис. 3ж, з). Следовательно, протоны, дающие сигналы при 7,32; 7,39 и 6,98 м.д., связаны спин-спиновым взаимодействием и являются соответственно протонами при C2 и C6, C3 и C5 и C4 кольца одного остатка фенилаланина (Phe II). Облучение интенсивного сигнала при 7,32 м.д. приводит также к тому, что двухпротонный дублетный сигнал при 6,90 м.д. становится синглетным, что позволяет отнести сигнал при 6,90 м.д. к протонам при C2 и C6, а сиг-

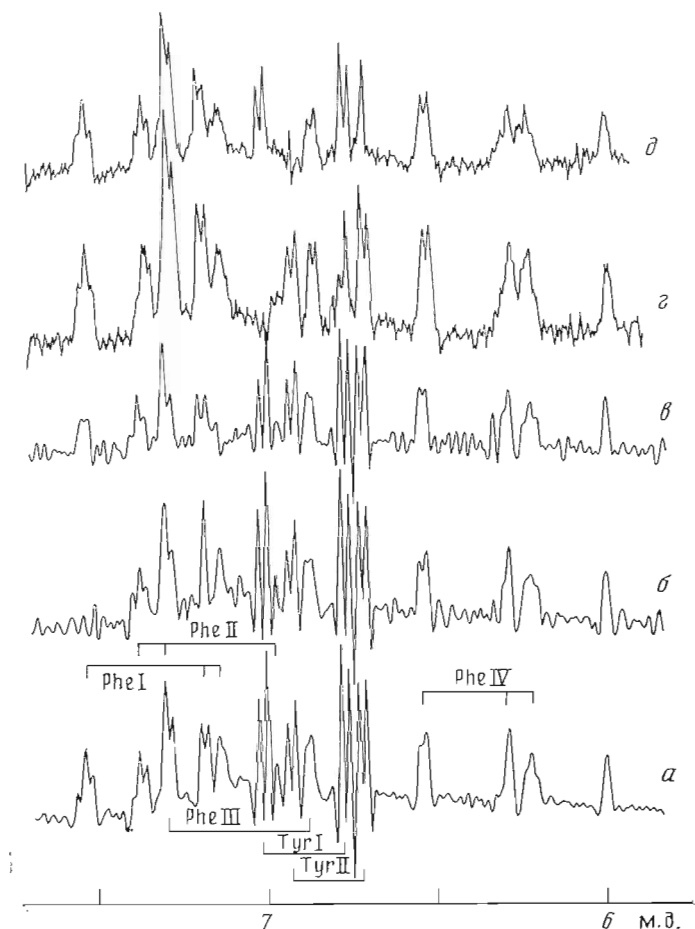
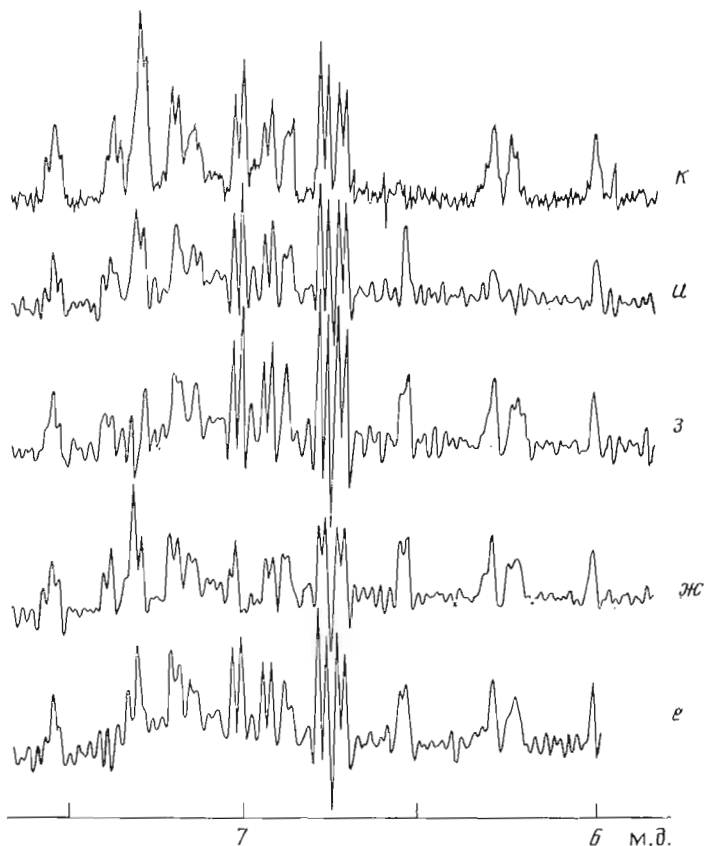


Рис. 2. Спектры двойного резонанса белка L11: исходный (а); полученные при облучении на частоте сигнала при 7,55 (б), 7,16 (в), 7,02 (г), 6,93 (д), 7,39 (е), 6,98 (ж), 7,32 (з), 6,22 (и), 6,55 м.д. (к)

нал при 7,32 м.д. — к протонам при С3 и С5 кольца остатка Phe III. Таким образом, сигнал при 7,32 м.д. содержит сигналы от протонов при С2 и С6 остатка Phe II и С3 и С5 — остатка Phe III.

Сигналы при 6,55 и 6,22 м.д. интенсивностью в два протона каждый могут быть отнесены соответственно к ароматическим протонам при С2 и С6 и С3 и С5 четвертого из фенилаланиновых остатков (Phe IV), так как при облучении мультиплетного сигнала при 6,22 м.д. дублетный сигнал при 6,55 м.д. становится сплелетным, а при облучении сигнала при 6,55 м.д. сигнал при 6,22 м.д. сужается. Кроме того, разностный спектр УЭО (рис. 3г), полученный при облучении сигнала при 6,22 м.д., позволяет предположить, что двухпротонный сигнал при 6,32 м.д. происходит от двух неэквивалентных протонов, одним из которых является протон при С4 кольца остатка Phe IV. Многокомпонентную структуру этого сигнала можно наблюдать, например, на спектрах рис. 2.

Идентификация сигналов от протонов ароматических остатков позволила установить значительные различия в химических сдвигах сигналов от кольцевых протонов четырех фенилаланиновых остатков. Сигналы одинаковых по положению в кольце протонов различаются по химическим сдвигам вплоть до 1,33 м.д. Так, химический сдвиг для протонов при С3 и С5 остатка Phe I составляет 7,55 м.д., для протонов при С3 и С5 остатка Phe IV — 6,22 м.д. Такое большое различие химических сдвигов свидетельствует о специфическом стабильном окружении каждого из остатков фенилаланина, что прямо указывает на наличие компактной глобулярной структуры молекулы белка L11 в растворе.



Ядерный эффект Оверхаузера и третичная структура белка L11. Метод ЯЭО может быть использован для определения расстояния между протонами [13] и позволяет выявлять ближайшее ($\leq 0,5$ нм) окружение исследуемых ядер [14, 15].

На рис. 3 и 4 представлены разностные спектры ЯЭО, полученные при облучении некоторых сигналов из ароматической области спектра.

Облучение сигнала при 7,55 м.д. от химически эквивалентных протонов при С3 и С5 остатка Phe I (рис. 3) приводит к большому внутриостаточному ЯЭО (сигналы при 7,20 и 7,16 м.д. протонов при С2, С6 и С4 остатка Phe I) и к заметному межостаточному эффекту (сигнал при 7,32 м.д., который отнесен как к остатку Phe II, так и к остатку Phe III).

Облучение сигнала при 7,39 м.д. от протонов при С3 и С5 остатка Phe II вызывает появление внутриостаточного ЯЭО и заметный межостаточный ЯЭО (сигналы при 7,55; 7,20 и 7,16 м.д. от протонов при С3 и С5, С2 и С6 и С4 остатка Phe I и сигнал при 6,90 м.д. от протонов при С2 и С6 остатка Phe III).

Аналогично, при облучении и других сигналов от кольцевых протонов остатков Phe I, Phe III и Phe IV наблюдаются ЯЭО как внутри остатков, так и между остатками. Так, при облучении сигнала от протонов С3 и С5 остатка Phe IV (рис. 3) наблюдается заметный эффект от протонов при С3 и С5 остатка Phe I (7,55 м.д.) и при С2 и С6 остатка Phe III (6,90 м.д.).

Значения ЯЭО для внутриостаточных взаимодействий в описанных выше экспериментах находятся в пределах 25–40%, а для межостаточных — в пределах 10–20% (знак эффекта отрицательный).

Из полученных данных по ЯЭО можно полагать, что остаток Phe I пространственно близок к остатку Phe II, Phe III — к Phe IV, а Phe IV — к Phe I, т. е. все остатки Phe пространственно сближены. Такой вывод

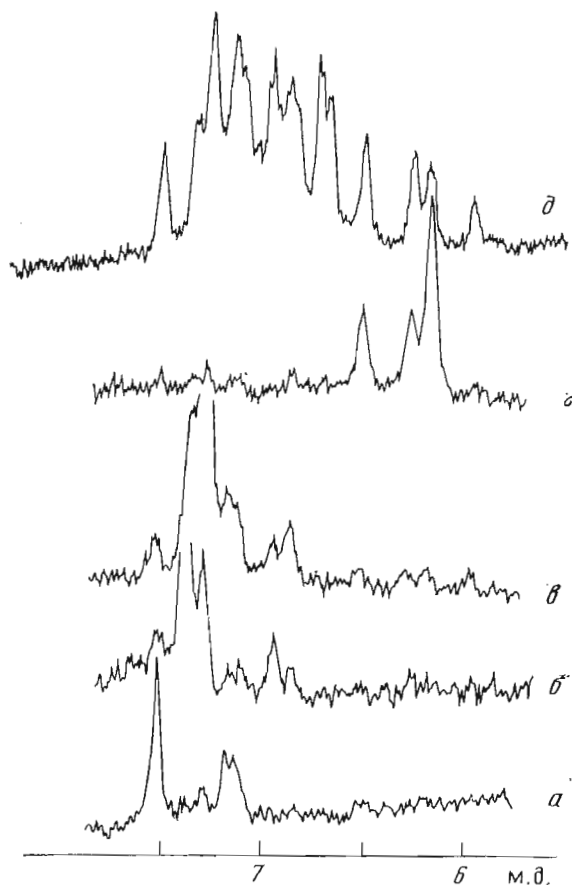


Рис. 3. Разностные спектры ЯЭО (ароматическая область спектра), полученные при облучении на частоте сигнала при 7,55 (а), 7,39 (б), 7,32 (в), 6,22 м.д. (г); δ — исходный спектр. Время облучения 0,7 с

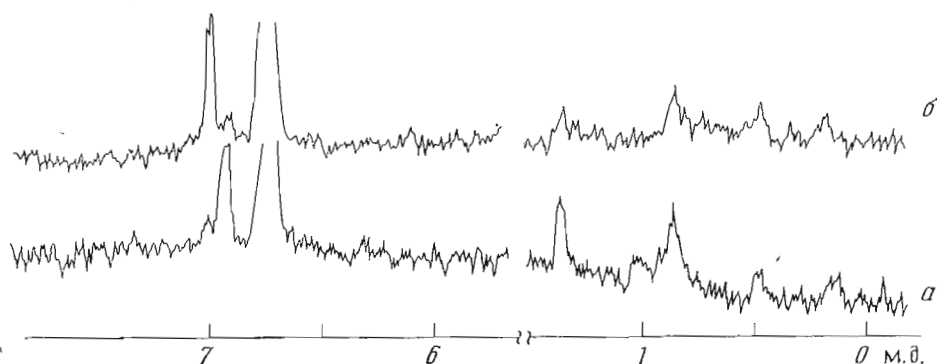


Рис. 4. Разностные спектры ЯЭО, полученные при облучении на частоте сигнала при 6,73 (а) и 6,77 м.д. (б). Время облучения 0,7 с

объясняет и значительную вариацию химических сдвигов кольцевых протонов фенилаланинов, поскольку, как упоминалось выше, кольцевые токи соседних фенилаланинов в зависимости от расстояния и взаимной ориентации могут сдвигать сигналы друг друга как в высокое, так и в низкое поле.

Непосредственно измерить ЯЭО между протонами двух различных тиозинов не удалось, поскольку расстояние между сигналами от остатков Тир I и Тир II в спектре белка не превышает 30 Гц. Однако разностные спектры, полученные при облучении протонов при C3 и C5 остатков Тир I и Тир II, почти полностью совпадают в области 0—2 м.д. (рис. 4).

Это позволяет предположить, что оба остатка тирозина пространственно близки к одной и той же группе в молекуле белка.

Таким образом, можно сделать вывод, что в структуре молекулы белка L11 остатки Phe-37, Phe-41, Phe-66 и Phe-68, а также Tug-7 и Tug-61 пространственно сближены. Поскольку все эти остатки находятся в N-концевой половине молекулы белка [3], можно говорить о компактной структуре N-концевой части (по крайней мере с 1-го до 69-го аминокислотного остатка) молекулы белка L11.

Следовательно, совокупность полученных данных о химических сдвигах и величине ЯЭО позволяет предположить, что молекула белка L11 в растворе, по крайней мере ее N-концевая часть, имеет компактную глобулярную структуру.

Экспериментальная часть

Выделение белка L11 проводили как описано ранее [4]. Идентификация, чистота и гомогенность белка подтверждены аминокислотным анализом и электрофорезом в 6% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Для получения спектров протонного магнитного резонанса белок L11 был переведен в фосфатный буфер с pH 6,6, содержащий $^2\text{H}_2\text{O}$, 20 мМ Na-фосфат 0,3 М KCl.

Спектры ПМР сняты на спектрометре WH-360 (Bruker, ФРГ) в импульсном режиме с последующим фурье-преобразованием. Длительность импульса 8 мкс, время одного цикла 1,8 с. Число накоплений составляло 2000–3000. Химические сдвиги измерены относительно внутреннего эталона 2,2-диметил-2-силилпента-5-сульфоната натрия (DSS). Спектры сняты в стандартных 5-мл ампулах. Концентрация белка 3–4 мг/мл.

В ЯЭО-экспериментах для подавления сигнала от H^2O применялась импульсная последовательность ($180^\circ-\tau-90^\circ-\text{ССИ}$), где 180° — селективный импульс на частоте сигнала от H^2O , τ — время, в течение которого намагниченность спадает до нуля, 90° — обзорный импульс длительностью 8 мкс, ССИ — сигнал свободной индукции [19]. Величина τ выбиралась по минимуму сигнала от H^2O в спектре белка и составила 0,7 с при длительности селективного импульса 35 мс и длительности цикла 2,7 с. Разностные спектры ЯЭО получены методом, описанным в работе [14], который был дополнен импульсной последовательностью для подавления сигнала от H^2O , так что использовалась такая последовательность импульсов: $[(180^\circ-\tau_2-\tau_1^*-90^\circ-\text{ССИ})-(180^\circ-\tau_2-\tau_1-90^\circ-\text{ССИ})]_n$, где 180° — селективный импульс на частоте сигнала от H^2O , 90° — обзорный импульс, τ_1^* и τ_1 — длительность соответственно резонансного и внерезонансного насыщающих импульсов (в экспериментах изменялась от 0,1 до 0,7 с). Величина задержки τ_2 удовлетворяла условию $\tau_1+\tau_2=\tau_1^*+\tau_2=0,7$ с. 180° -градусный селективный импульс и насыщающие импульсы создавались одним и тем же генератором, выходное напряжение которого в режиме насыщения ослаблялось в 10 раз. Величина радиочастотного поля $\gamma\text{H}_2/2\pi$ в режиме подавления сигнала от H^2O составляла 14,3 Гц, а в режиме насыщения для измерения ЯЭО — 1,4 Гц. Накопление проводилось в одном блоке памяти, число накоплений $n=4000-10\,000$, продолжительность одного эксперимента от 4 до 10 ч, объем образца 0,4 см³, температура 19°С.

В заключение авторы выражают благодарность акад. А. С. Спирину за инициацию работы, а также Л. А. Сибельдиной за предоставленную возможность получения ЯМР-спектров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kazemie M. Eur. J. Biochem. 1975, v. 58, № 2, p. 501–510.
2. Littlechild J., Dijk J., Garrett R. A. FEBS Lett., 1977, v. 74, № 2, p. 292–294.
3. Dognin M. J., Wittmann-Liebold B. FEBS Lett., 1977, v. 84, № 2, p. 342–346.
4. Гудков А. Т., Туманова Л. Г. Молекулярн. биология, 1979, т. 13, № 4, с. 798–803.
5. Giri L., Dijk J., Labischinski H., Bradezek H. Biochemistry, 1978, v. 17, № 4, p. 745–749.

6. Khechinashvili N. N., Koteliansky V. E., Gogia Z. V., Littlechild J., Dijk J. FEBS Lett. 1978, v. 95, № 2, p. 270-272.
7. Wüthrich K. NMR in Biological Research: Peptides and Proteins. North Holland, Amsterdam, 1976.
8. McDonald C. C., Phillips W. D. J. Amer. Chem. Soc., 1969, v. 91, № 6, p. 1513-1521.
9. Sternlicht H., Wilson D. Biochemistry, 1967, v. 6, № 9, p. 2882-2892.
10. Perkins S. J., Wüthrich K. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 576, № 2, p. 409-423.
11. Campbell I. D., Dobson C. M., Williams R. J. P., Xavier A. V. J. Magn. Res., 1973, v. 11, № 2, p. 172-181.
12. Roberts G. C. K., Jardetzky O. Adv. Prot. Chem., 1970, v. 24, p. 447-454.
13. Noggle J. H., Schirmer R. E. The nuclear Overhauser effect. N. Y.: Acad. Press, 1971.
14. Dubs A., Wagner G., Wüthrich K. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 577, № 1, p. 177-194.
15. Wagner G., Wüthrich K. J. Magn. Res., 1979, v. 33, № 3, p. 675-680.
16. Krause S., O'Konski C. T. Biopolymers, 1963, v. 1, № 6, p. 503-515.
17. Kalk A., Berendsen H. J. Magn. Res., 1976, v. 24, № 3, p. 343-366.
18. Campbell I. D., Dobson C. M., Williams R. J. P. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1974, № 21, p. 888-889.
19. Gupta R. K. J. Magn. Res., 1976, v. 24, № 3, p. 461-465.

Поступила в редакцию
9.III.1981

После доработки
18.VI.1981

GLOBULAR STRUCTURE OF PROTEIN L11 FROM *ESCHERICHIA COLI* RIBOSOMES IN SOLUTION. A PROTON MAGNETIC RESONANCE STUDY

BUSHUEV V. N., OKON M. S., GUDKOV A. T., TUMANOVA L. G.

*Institute of Biological Physics and Institute of Protein Research,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino*

Protein L11 from the 50S subparticle of *E. coli* ribosomes was studied in a $^2\text{H}_2\text{O}$ solution by ^1H NMR at 360 MHz. Homonuclear double resonance was used to assign the signals of the aromatic residue side chains to the residue types. It was shown that both phenylalanine and tyrosine residues are spatially proximal. The data obtained suggest that the protein L11 molecule, at least its N-terminal part including residues 4-69, has a compact globular structure.