

1987, 36, 2

УДК 577.325; 543.422.25

Ю. ЯРВЕТ, Абира ОЛИВСОН, Э. ЛИППМАА, Резт АГУРАЙУЯ

**<sup>13</sup>С-ЯМР-ИССЛЕДОВАНИЕ КОРОВЬЕГО  $\alpha$ -ЛАКТАЛЬБУМИНА.  
ЗАВИСИМОСТЬ СПЕКТРАЛЬНЫХ И РЕЛАКСАЦИОННЫХ  
ХАРАКТЕРИСТИК ОТ КОНФОРМАЦИИ**

Методом <sup>13</sup>С-ЯМР высокого разрешения показано, что при переходе из нативной (рН 7,3) в кислую (рН 2,2) конформацию в макромолекуле коровьего  $\alpha$ -лактальбумина разрушается уникальная пространственная структура, однако частично сохраняется локальная внутримолекулярная организация. Этот вывод следует из наблюдаемой структуры спектров и из слабого различия релаксационных параметров  $\alpha$ - и ароматических углеродных атомов при переходе из нативной формы в кислую. Проведен анализ молекулярной динамики полипептидной цепи коровьего  $\alpha$ -лактальбумина в нативной конформации по методу Липари и Сабо на основе измерений  $T_1$  и ядерных эффектов Оверхаузера для  $\alpha$ -углеродных атомов в двух поляризующих магнитных полях.

\* \* \*

Для исследования биомacroмолекул в настоящее время широко применяется спектроскопия ЯМР высокого разрешения на ядрах <sup>13</sup>С, технические возможности которой достигли уровня, допускающего регистрацию спектров <sup>13</sup>С-ЯМР в таких системах с природным содержанием (1,108%) магнитного изотопа <sup>13</sup>С. Удастся фиксировать не только конформационнозависимые изменения в спектрах, но и связанные с ними изменения молекулярной подвижности.

В настоящей работе спектроскопия ЯМР на ядрах <sup>13</sup>С применяется для изучения изменений конформации и молекулярной динамики в коровьем  $\alpha$ -лактальбумине на первом этапе процесса денатурации. Известна первичная структура этого белка [1], а также достаточно детально изучено изменение в ходе денатурации его оптических свойств [2, 3]. Эти исследования вместе с измерением скоростей дейтерообмена и микрокалориметрическими измерениями указали на то, что денатурация  $\alpha$ -лактальбумина, а также ряда других однодоменных белков под воздействием сильного денатуранта или температуры происходит через некоторые стабильные промежуточные состояния, характеризующиеся свойствами нативного и развернутого состояния одновременно [4].

Ниже излагаются результаты первого экспериментального исследования изменений спектральных и релаксационных (динамических) ЯМР-характеристик ядер <sup>13</sup>С в двух формах коровьего  $\alpha$ -лактальбумина — нативной (при рН 7,3) и кислой (при рН 2,2) в двух сильных поляризующих магнитных полях (8,45 и 11,7 Т).

## Экспериментальная часть

Коровий  $\alpha$ -лактальбумин выделен и очищен в Институте белка АН СССР по методике, описанной в [4].

Измерения проводились на ЯМР-спектрометрах СХР-360 и АМ-500 фирмы «Bruker» при резонансных частотах для ядер  $^{13}\text{C}$  90,55 и 125,7 МГц соответственно. В обоих спектрометрах реализовано Фурье-преобразование и развязка от протонов многоимпульсными последовательностями WALTZ-64 [5] (в СХР-360) и MLEV-16 [6] (в АМ-500). Это позволило осуществить эффективно широкополосную ( $\pm 5$  кГц) развязку от протонов при умеренных радиочастотных мощностях ( $\sim 2$  Вт), не вызывающих существенного нагрева образца.

Эксперимент проводили при температуре  $13 \pm 1^\circ\text{C}$ , которая поддерживалась воздушным охлаждением. Температурный датчик — термпару — помещали в измерительную головку вблизи основания образца, контроль температуры в образце осуществляли химическим термометром — капилляром со смесью  $\text{CH}_3\text{I}/(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ , который одновременно служил также внешним стандартом для калибровки химических сдвигов.

Времена спин-решеточной релаксации  $T_1$  измерены стандартным методом инверсии—восстановления. Длительность  $\pi$ -импульса в головке спектрометра СХР-360 составляла 56 мкс. В спектрометре АМ-500 реализовано широкополосное инвертирование  $\pi$ -импульсом, комбинированным 7-импульсной последовательностью когерентных сдвинутых по фазе импульсов по методу, предложенному Р. Тайко [7] (суммарная длительность  $\pi$ -импульса 173 мкс); длительность  $\pi/2$ -импульса равнялась 17 мкс. Времена задержки между последовательными регистрациями спада сигнала свободной индукции составляли не менее  $3T_1$  из расчета максимальных значений  $T_1$ , ожидаемых для четвертичных атомов углерода ароматических колец.

Концентрация  $\alpha$ -лактальбумина в  $\text{D}_2\text{O}$  для всех образцов находилась в пределах 6,95—4,40 %.

## Результаты и обсуждение

Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР различных форм коровьего  $\alpha$ -лактальбумина, зарегистрированные в двух поляризующих магнитных полях\* (рис. 1 и 2), свидетельствуют о том, что  $^{13}\text{C}$ -ЯМР весьма чувствителен к структурным изменениям не только в случае более простых молекул, спектр которых состоит из узких, хорошо разрешенных сигналов, но и в случае биомакромолекул сложной структуры, спектр которых содержит большое количество перекрывающихся сигналов. Выгодное преимущество этого вида спектроскопии перед традиционным ЯМР протонов кроется в общей структуре спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР, в которых хорошо разделены области спектра, характерные для отдельных функциональных групп (см. рис. 1).

Известно, что положение сигнала в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР развернутой полипептидной цепи слабо зависит от места аминокислотного остатка в первичной структуре. Сильная дисперсия химических сдвигов для сигналов от идентичных функциональных групп в одинаковых остатках глобулярных белков объясняется главным образом различием в их электронном микроокружении, которое связано с пространственной, или третичной, структурой макромолекулы [8]. Именно поэтому спектр нативного  $\alpha$ -лактальбумина намного сложнее и содержит гораздо больше частично разрешенных, хотя и сильно перекрывающихся сигналов, чем спектр даже полностью денатурированного образца.

Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР кислой формы приближается к спектру денатуриро-

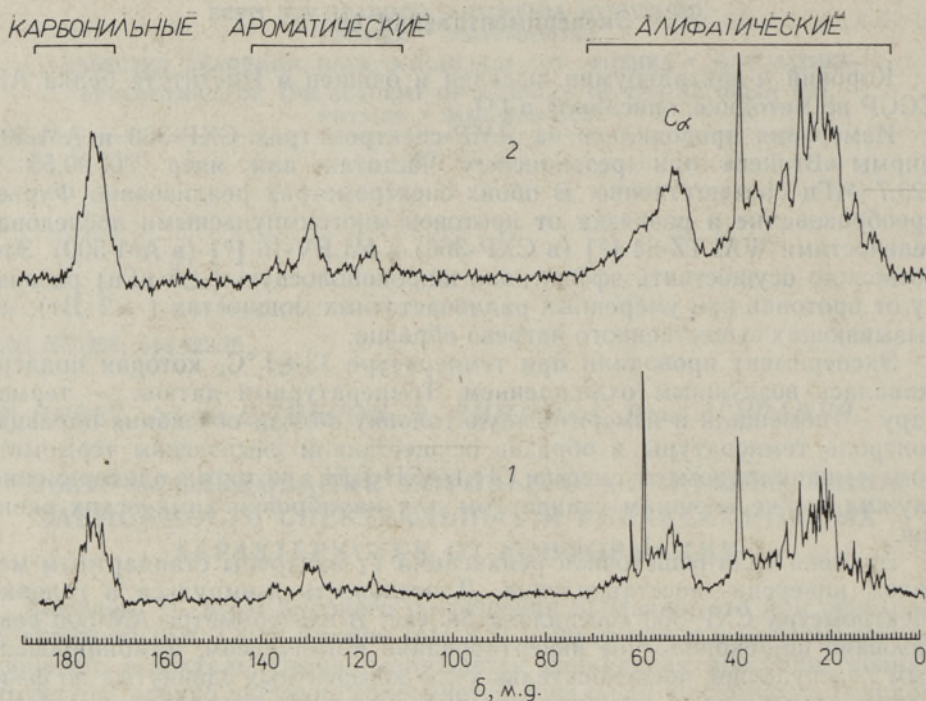


Рис. 1. Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР нативной (1) и кислой (2) форм коровьего  $\alpha$ -лактальбумина ( $H_0=11,7$  Т).

ванного белка, однако отличается от последнего значительно большей шириной наблюдаемых сигналов. Этот факт нельзя объяснить, например, неоднородностью поляризующего поля, ибо воспроизводимость спектра от одного образца при разделенных во времени повторных регистрациях на резонансной частоте 90,55 МГц достаточно высока; совпадают также спектры, зарегистрированные при разных резонансных частотах. Сказанное выше позволяет предположить, что наблюдаемый спектр принадлежит белку, молекула которого лишена уникальной пространственной структуры. Значительная ширина сигналов в спектре при уменьшении их числа по сравнению со спектром нативного белка связана, по-видимому, с уменьшением, но далеко не полным исчезновением дисперсии химических сдвигов от одинаковых атомов углерода из-за потери пространственной организации при по крайней мере частичном сохранении вторичной структуры.

Разрушение третичной структуры связано с ослаблением дальних специфических взаимодействий. Учитывая, что ближние взаимодействия за счет водородных связей при этом сохраняются, переход из нативной конформации в кислую необязательно должен сопровождаться сильным изменением молекулярной динамики, иными словами, релаксационные характеристики системы при таком переходе могут измениться незначительно. Действительно, из релаксационных спектров, представленных на рис. 3, видно, что времена  $T_1$   $\alpha$ -углеродных атомов нативного  $\alpha$ -лактальбумина различаются мало и близки к таковым для кислой формы:  $T_1$  и  $\eta$  при резонансных частотах 90,55 и 125,7 МГц для нативного белка равны соответственно 0,8 с, 1,3—1,4 и 1,4 с, 1,3—1,5, а для кислой формы — 0,9 с, 1,3—1,5 и 1,7 с, 1,3—1,7. Следует подчеркнуть, что характер распределения  $T_1$  по области спектра, относящейся к  $\alpha$ -углеродным ато-

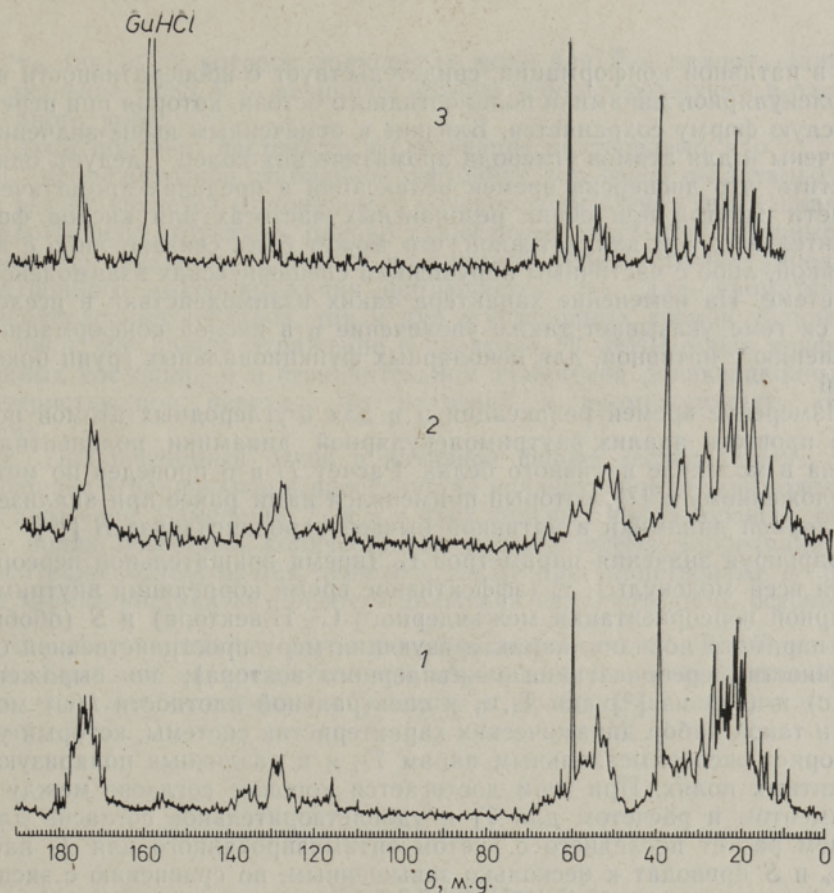


Рис. 2. Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР нативной (1), кислой (2) и денатурированной (3) форм коровьего  $\alpha$ -лактальбумина ( $H_0=8,45\text{ T}$ ).

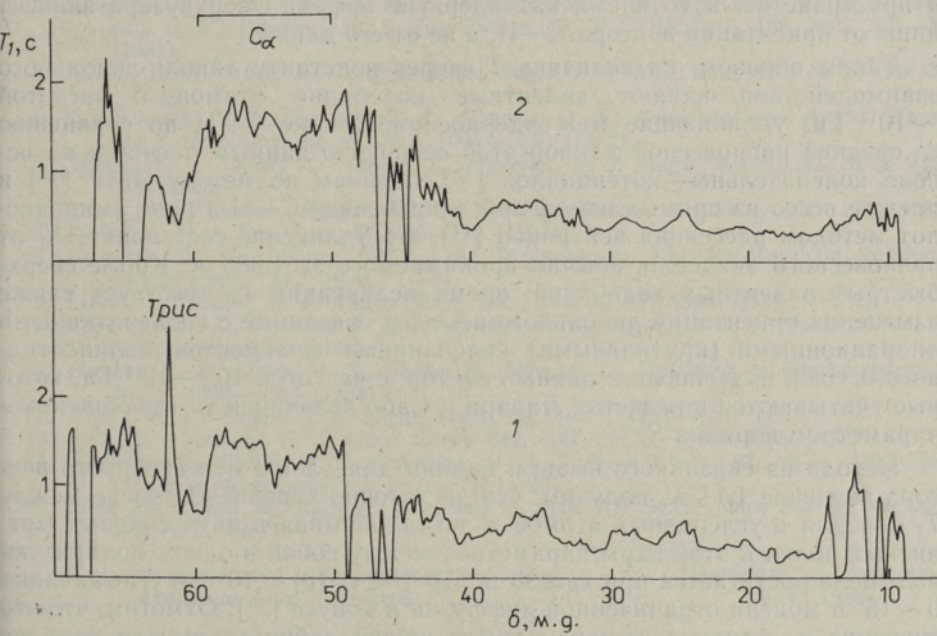


Рис. 3. Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-релаксации нативной (1) и кислой (2) форм коровьего  $\alpha$ -лактальбумина ( $H_0=11,7\text{ T}$ ).

мам в нативной конформации, свидетельствует о кооперативности внутримолекулярной динамики полипептидного остова, которая при переходе в кислую форму сохраняется. Близкие к отмеченным выше значения  $T_1$  получены и для атомов углерода ароматических колец. Следует, однако, заметить, что дисперсия времен релаксации в пределах ароматической области спектра при обеих резонансных частотах для кислой формы значительно выше, чем для нативной, что может быть связано либо с перестройкой, либо с частичным нарушением специфических взаимодействий в системе. На изменение характера таких взаимодействий в исследуемой системе указывает также увеличение  $\eta$  в кислой конформации, по сравнению с нативной, для неполярных функциональных групп боковых цепей.

Измерение времен релаксации и  $\eta$  для  $\alpha$ -углеродных атомов позволило провести анализ внутримолекулярной динамики полипептидного остова в молекуле нативного белка. Расчет  $T_1$  и  $\eta$  проведен по методу, предложенному в [9], который применялся нами ранее при анализе молекулярной динамики в нативной бычьей карбоангидразе В [10].

Варьируя значения параметров  $\tau_R$  (время вращательной переориентации всей молекулы),  $\tau_e$  (эффективное время корреляции внутримолекулярной переориентации межъядерного C—H-вектора) и  $S$  (обобщенный параметр порядка, характеризующий меру пространственной ограниченности переориентации межъядерного вектора), по выражениям (7а, с) и (35) из [9] для  $T_1$ ,  $\eta$  и спектральной плотности  $J(\omega)$  можно найти такой набор динамических характеристик системы, который удовлетворяет экспериментальным парам  $T_1$ ,  $\eta$  в различных поляризующих магнитных полях. При этом достигается хорошее согласие между экспериментом и расчетом для  $T_1$  и удовлетворительное согласие для  $\eta$ , причем расчет последнего с учетом оптимизированного для  $T_1$  набора  $\tau_R$ ,  $\tau_e$  и  $S$  приводит к несколько завышенным, по сравнению с экспериментом, значениям  $\eta$  [9, 10, 11].

Заметим, что при расчете времени диполь-дипольной релаксации следует учитывать как длину межъядерного вектора, так и его ориентацию в пространстве, в то время как ядерный эффект Оверхаузера зависит лишь от ориентации вектора C—H, а не от его длины.

Таким образом, на величину  $T_1$  через константу диполь-дипольного взаимодействия влияют валентные колебания атомов с частотой  $\sim 10^{14}$  Гц, удлиняющие межъядерное расстояние C—H по сравнению со средней равновесной длиной этой связи. По данным расчетов на основе колебательных потенциалов [12], оценкам по методу ЯМР [13] и прежде всего из прямых измерений длины связи C—H в ряде аминокислот методом рассеяния нейтронов [14], это удлинение составляет 1% от равновесного значения, обычно принимаемого за 1,085 Å. Кроме сверхбыстрых валентных колебаний, время релаксации  $T_1$  чувствует также изменения ориентации дипольного вектора, связанные с кооперативными либрационными (крутильными) колебаниями фрагментов полипептидного остова, включающих данный вектор, с частотой  $10^{10}$ — $10^{11}$  Гц, которые учитываются в расчетах Липари и Сабо величиной  $\tau_e$  и обобщенным параметром порядка  $S$ .

Исходя из сказанного выше и приняв для длины межъядерного вектора значение 1,11 Å, получим, что достаточно хорошее согласие между  $T_1$  и  $\eta$  для  $\alpha$ -углеродных атомов  $\alpha$ -лактальбумина в двух сильных магнитных полях и этой пары параметров между собой в одном поляризующем поле достигается при  $\tau_R \approx 30$  нс,  $10^{-10} < \tau_e(c) < 10^{-9}$  и угле качания  $\theta \sim 15^\circ$  в модели ограниченной диффузии в конусе [10]. Отметим, что это значение  $\tau_R$  ближе к измеренному в нашей лаборатории для того же образца и при тех же экспериментальных условиях методом динамической деполяризации флуоресценции ( $\tau_R = 34$  нс [15]), чем значение

$10 < \tau_R \text{ (нс)} < 20$ , которое получается, если для  $R_{CH}$  принять заниженное значение  $1,085 \text{ \AA}$  — величину, обычно использовавшуюся в расчетах подобного рода.

Таким образом, настоящее исследование подтвердило, что

1. промежуточное стабильное состояние коровьего  $\alpha$ -лактальбумина при pH 2,2 является состоянием, в котором отсутствует уникальная пространственная структура, однако существует локальная внутримолекулярная организация. При этом по крайней мере частичное усреднение электронного микроокружения наблюдается как для ароматических аминокислотных остатков, так и для  $\alpha$ -углеродных атомов полипептидной цепи, что нашло отражение в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР обоих конформационных состояний и в незначительном изменении релаксационных характеристик при переходе из нативной в промежуточную кислую форму.

2. Полипептидный остов в нативной форме исследованного белка совершает ограниченное в пространстве коллективное внутримолекулярное движение. Измерение  $T_1$  и  $\eta$  в двух сильных поляризующих магнитных полях позволило количественно оценить время корреляции переориентации молекулы как целого, а также пространственные и временные характеристики внутреннего движения полипептидного остова.

Авторы выражают глубокую благодарность О. Б. Птицыну и В. Е. Бычковой за предоставление образца коровьего  $\alpha$ -лактальбумина и за ценные обсуждения, побудившие к проведению данного исследования.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Brew, K., Castellino, F. J., Vanaman, T. C., Hill, R. L. J. *Biol. Chem.*, **245**, № 17, 4570—4582 (1970)
2. Dolgikh, D. A., Gilmanshin, R. I., Brazhnikov, E. V., Bychkova, V. E., Semisotnov, G. V., Venyaminov, S. Yu., Ptitsyn, O. B. *FEBS Lett.*, **136**, № 2, 311—315 (1981).
3. Kuwajima, K., Nitta, K., Yoneyama, M., Sugai, S. J. *Mol. Biol.*, **106**, № 2, 359—373 (1976).
4. Гильманин Р. И., Долгих Д. А., Птицын О. Б., Фinkelштейн А. В., Шахнович Е. И. *Биофизика*, **27**, № 6, 1005—1010 (1982).
5. Shaka, A. J., Keeler, J., Frenkel, T., Freeman, R. J. *Magn. Reson.*, **52**, № 2, 335—338 (1983).
6. Levitt, M., Freeman, R., Frenkel, T. J. *Magn. Reson.*, **50**, № 1, 157—162 (1982).
7. Tycko, R. *Phys. Rev. Lett.*, **51**, 775—777 (1983).
8. Howarth, O. W., Lilley, D. M. J. In: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **12**, 1979, 1—41.
9. Lipari, G., Szabo, A. J. *Amer. Chem. Soc.*, **104**, № 17, 4546—4559 (1982).
10. Ярвет Ю. И.-Х., Оливсон А. И., Агурайя Р. К., Липпмаа Э. Т. *Молек. биол.*, **19**, № 5, 1358—1366 (1985).
11. Hughes, L. T., Cohen, J. S., Szabo, A., Nice, C.-L., Matsuura, S. *Biochemistry*, **23**, № 19, 4390—4394 (1984).
12. Henry, E. R., Szabo, A. J. *Chem. Phys.*, **82**, № 11, 4753—4761 (1985).
13. Dill, K., Allerhand, A. J. *Amer. Chem. Soc.*, **101**, № 15, 4376—4378 (1979).
14. Hemethy, G., Pottle, M. S., Scheraga, H. A. J. *Phys. Chem.*, **87**, № 11, 1883—1887 (1983) и имеющиеся там ссылки [14—26].
15. Метс Ю., Поога М., Каск П., Липпмаа Э. *Изв. АН ЭССР. Физ. Матем.*, **36**, № 2, 165—171 (1987).

Институт химической и биологической физики  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
26/VI 1986

$\alpha$ -LAKTALBUMIINI UURIMINE  $^{13}\text{C}$ -TMR MEETODIGA.  
SPEKTRAAL- JA RELAKSATSIOONIKARAKTERISTIKUTE SÖLTUVUS  
KONFORMATSIOONIST

Töös uuriti lehma  $\alpha$ -laktalbumiini erinevate konformatsioonide spektraal- ja relaksatsioonikarakteristikuid kahes tugevas polariseerivas magnetväljas (8,45 ja 11,7 T) kõrge lahutusvõimega  $^{13}\text{C}$ -TMR meetodil. Järeldati makromolekuli unikaalse keemilise struktuuri lagunemist üleminekul valgu natiivsest vormist (pH 7,3) happelisse konformatsiooni (pH 2,2), kusjuures osaliselt säilib lokaalne sisemolekulaarne struktuur. Mõõdetud spinn-võre relaksatsiooni  $T_1$  ja Overhauseri efekti  $\eta$  andmete põhjal analüüsiti natiivse vormi põhiahela dünaamikat Lipari ja Szabo meetodil, võttes arvesse aatomite valentsvõngete mõju dipool-dipoolinteraktsiooni konstandile. Analüüsi tulemusel saadi  $\tau_R = 30$  nsek,  $10^{-10} < \tau_e$  (sek)  $< 10^{-9}$  ja  $\theta \sim 15^\circ$ .

J. JÄRVET, Abira OLIVSON, E. LIPPMÄÄ, Reet AGURAIUJA

$^{13}\text{C}$ -NMR STUDY OF BOVINE  $\alpha$ -LACTALBUMIN. THE CONFORMATION  
DEPENDENCE OF SPECTRAL AND RELAXATION PARAMETERS

The investigation of spectral and relaxation parameters of  $\alpha$ -lactalbumin in different molecular states (native at pH 7.3, acidic at pH 2.2 and the denaturated form) by high resolution  $^{13}\text{C}$ -NMR in two strong magnetic fields (8.45 and 11.7 Tesla) is presented. The model-free approach of Lipari and Szabo to the interpretation of the experimental data of  $\alpha$ -carbons show a satisfactory agreement between theory and experiment in both magnetic fields if an internal degree of cooperative librational motion of the chain with an angular amplitude of about  $15^\circ$ , an effective correlation time in the  $10^{-10} < \tau_e < 10^{-9}$  (s) range and the value  $\tau_R = 3 \cdot 10^{-8}$  s for the reorientation correlation time of the whole molecule (at  $13 \pm 1^\circ\text{C}$ ), along with lengthening of the effective internuclear C—H distance by the stretching vibrations ( $r_{\text{eff}} \approx 1.11 \text{ \AA}$ ), are accepted.