

УДК 577.355

**ИССЛЕДОВАНИЕ  $\text{Ca}^{2+}$ -СВЯЗЫВАЮЩИХ ЦЕНТРОВ  
ПАРВАЛЬБУМИНА ПО ДАЛЬНЕЙ ТОНКОЙ СТРУКТУРЕ  
РЕНТГЕНОВСКИХ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ****А. А. ВАЗИНА, А. Ф. КОРЫСТОВА, В. М. ШЕЛЕСТОВ, С. Е. ВЕРНОСЛОВ\*,  
В. Ю. ЛУНИН\*, М. А. КОЗЛОВ\*\*, В. Л. КРАЙЗМАН\*\*\***

*Институт биофизики Академии наук СССР, Пущино, Московская область  
\* Научно-исследовательский вычислительный центр Академии наук СССР, Пущино,  
Московская область*

*\*\* Институт катализа Сибирского отделения Академии наук СССР, Новосибирск*

*\*\*\* Научно-исследовательский институт физики Ростовского университета,  
Ростов-на-Дону*

Проведено исследование  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центров парвальбуминов II и III методом анализа дальней тонкой структуры рентгеновских спектров поглощения (ДТСРСР) металла. Экспериментальные результаты получены на белковых препаратах парвальбумина II и III, в которых кальций ( $\text{Ca}^{2+}$ ) изоморфно замещался на тербий ( $\text{Tb}^{3+}$ ). Для анализа спектров использовали стандартную методику фурье-преобразования. Начало отсчета энергии выбирали на середине подъема первого максимума поглощения. Сопоставляя спектры и модули фурье-преобразования нормированной осциллирующей части рентгеновского спектра поглощения II и III компонентов парвальбумина, можно видеть, что спектры и фурье-трансформанты в интервале 2—6 Å совпадают. Это позволяет сделать заключение о совпадении координационных чисел, средних межатомных расстояний и их дисперсии относительно среднего значения в  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центрах обоих компонентов белка.

Известен ряд белков, способных связывать ионы  $\text{Ca}^{2+}$  с высокой константой связывания. Эти белки находятся в разных тканях, выполняют разные функции и отличаются по количеству  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центров. Методом рентгеноструктурного анализа расшифрована пространственная структура III компонента парвальбумина с разрешением 1,8 Å [1]. Пространственная структура остальных белков неизвестна.

Цель данной работы — исследование  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центров парвальбумина. В последние годы для исследования активных центров металлосодержащих белков успешно применяется анализ дальней тонкой структуры рентгеновских спектров поглощения (ДТСРСР) металла. Анализ ДТСРСР позволяет определить расстояние от атома металла до ближайших атомов по интерференционной картине с точностью ~0,01 Å. Интерференция волн первичного и рассеянного фотоэлектронов модулирует монотонный спад края полосы поглощения [2]. Измерения ДТСРСР используются в исследованиях белков, содержащих медь, железо, молибден, никель и другие достаточно тяжелые атомы, у которых энергия K- и L-края спектров поглощения лежит в области, удобной для эксперимента (от 1 до 2 Å). Однако при рассеянии на более легких атомах, например  $\text{Ca}^{2+}$ , возникают методические сложности, связанные с тем, что K-край спектра поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  лежит в мягкой рентгеновской области с  $\lambda$  3,35 Å; излучение с такой длиной волны сильно поглощается в воздухе. Эту сложность удается преодолеть, используя тот факт, что в  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белках ион  $\text{Ca}^{2+}$  замещается на ион  $\text{Tb}^{3+}$  с более высокой константой связывания. Кроме того, методом рентгеноструктурного анализа показано, что ион  $\text{Ca}^{2+}$  в парвальбумине III изоморфно замещается на ион  $\text{Tb}^{3+}$  [3]. L-край поглощения  $\text{Tb}^{3+}$  лежит в удобной экспериментальной области.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали спектрометр, действующий в Институте ядерной физики СО АН СССР [4]. Спектрометр состоит из монохроматора, двух ионизационных камер, служащих для измерения интенсивности излучения до и после образца, двух щелей до и после монохроматора и подставки для образцов. Для монохроматизации излучения использовали двойной монокристалл германия («Бабочка») с плоскостью 111 и межплоскостным расстоянием 3,26 Å. Расстояние между отражающими поверхностями 3 мм. Кристалл позволяет охватить диапазон длин волн от 0,8 до 3 Å. Выходной пучок при изменении угла падения

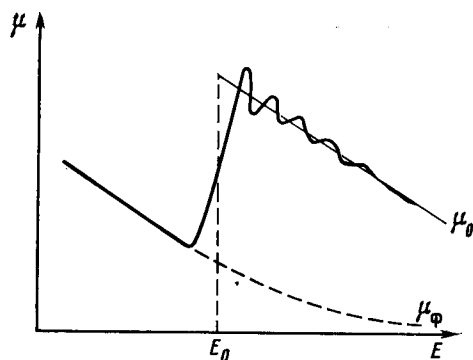


Рис. 1. Схематическое представление зависимости коэффициента поглощения от кинетической энергии фотоэлектрона

совершает вертикальные перемещения; при  $E=10$  кэВ и сканировании на 1 кэВ это перемещение составляет 0,02 мм. Ионизационная камера, измеряющая интенсивность излучения до образца, заполнена смесью 10% Ag+90% Ne при атмосферном давлении и имеет эффективность  $\sim 10\%$  в области  $L_{III}$ -края Tb<sup>3+</sup>. Вторая ионизационная камера, служащая для измерения интенсивности пучка, прошедшего через образец, заполнена Xe при атмосферном давлении и имеет 100%-ную эффективность. Работой спектрометра управляет ЭВМ «ODRA-1325» (Польша). Программа управления осуществляет полностью ав-

томатизированный набор спектра, который затем запоминается в виде отдельного файла на магнитном барабане ЭВМ. В процессе набора спектр выводится на дисплей, что позволяет оперативно управлять ходом набора информации. Программа позволяет также выводить ранее полученные спектры на дисплей и цифropечать в виде графиков и таблиц. Время набора спектра составляет 10—20 мин. Спектрометр позволяет получать спектры удовлетворительного качества от образцов, содержащих до 1—2 вес.% примеси тяжелого элемента в легкой матрице.

**Выделение белка и приготовление образцов.** Парвальбумины II и III выделяли из белых мышц зеркального карпа по методу, описанному Пешером и соавт. [5]. Метод был незначительно изменен. Чистоту белковых препаратов контролировали электрофорезом в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия [6]. Концентрацию парвальбумина II определяли спектрофотометрически, используя  $E_{259}^{1\%} - E_{300}^{1\%} = 1,94$  и  $E_{259}^{1\%} - E_{300}^{1\%} = 1,66$  для парвальбумина III [7].

Для замещения ионов Ca<sup>2+</sup>, связанных в норме с парвальбумином, на ионы Tb<sup>3+</sup> использовали раствор TbCl<sub>3</sub>, полученный реакцией углекислого тербия с соляной кислотой. Белок ( $10^{-3}$ — $10^{-4}$  М) титровали раствором Tb<sup>3+</sup> при pH 6,5 в 2 мМ буфере HEPES [8].

Белок лиофильно высушивали, тщательно растирали в агатовой ступке, равномерно размещали в специальной герметической кювете с лавсановыми (толщ.  $\sim 15$  мк) окнами.

**Получение структурной информации из ДТСРСП.** Схематическая зависимость коэффициента поглощения рентгеновского излучения от энергии  $E$  изображена на рис. 1. Через  $E_0$  обозначен порог ионизации исследуемой электронной оболочки атома определенного сорта. При  $E < E_0$  поглощение обусловлено электронами образца, имеющими меньшую энергию ионизации. Обозначим соответствующий коэффициент поглощения  $\mu_\phi$ . В область частот  $E > E_0$  величина  $\mu_\phi$  экстраполируется по закону Викторина  $\mu_\phi = (A/\omega^3) + (B/\omega^4)$ . Коэффициент поглощения определенной оболочки может быть представлен в виде:

$$\mu_a = \mu - \mu_\phi = \mu_0 (1 + \chi), \quad (1)$$

где  $\mu_0$  — коэффициент поглощения в отсутствие соседних атомов, а зависимость  $\chi$  от волнового числа «выбитого» электрона  $k$  дается соотношением

$$\chi(k) = \sum_i \frac{|f_i(k\pi)|}{kR_i^2} \sin(2kR_i + \delta_2(k) + \eta_i(k)) \exp(-2\sigma_i^2 k^2), \quad (2)$$

где  $R_i$  — расстояние от поглощающего атома до атома-рассеивателя,  $f_i(\pi)$  — модуль амплитуды рассеяния фотоэлектрона назад,  $\delta_2$  — парциальный сдвиг фазы рассеяния на центральном атоме с  $l=2$ ,  $\eta_i$  — сдвиг фазы фотоэлектронной волны при рассеянии на ближайшем атоме,  $\sigma_i^2$  — среднеквадратичное смещение атома из положения равновесия.

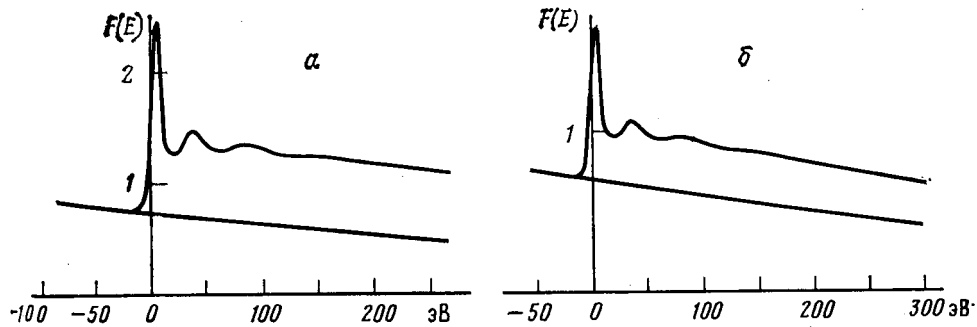


Рис. 2. Экспериментальные  $L_{III}$ -спектры  $Tb^{3+}$  II (а) и III компонент (б) парвальбумина в зависимости от кинетической энергии фотоэлектрона  $E_\phi$ .

Суммирование ведется по всем ближайшим атомам. Связь волнового числа  $k$  с энергией рентгеновского кванта  $E$  задается формулой

$$k = \sqrt{\frac{2m}{\hbar^2} (E - E_0)}.$$

В соотношении (2) предполагается, что переходы  $2p$ -электрона в свободные состояния  $d$ -симметрии имеют вероятность, значительно большую, чем переходы в  $s$ -состояния. Как видно из соотношения (2), зависимость  $\chi$  от  $k$  весьма сложна. Ситуация упрощается в результате того, что, как показывают теоретические расчеты и анализ экспериментальных результатов, функции  $f_i(k, \pi)$ ,  $\delta_2(k)$  и  $\eta_i(k)$  зависят от  $k$  очень плавно. В силу этого фурье-преобразование  $\chi(k)$ , проведенное по формуле

$$\varphi(r) = \left| \int_{k_1}^{k_2} \chi(k) k^2 \exp(-2ikr) dk \right|, \quad (3)$$

позволяет выделить максимум, соответствующий первой координационной сфере окружения, при  $r = R_1 - \alpha_1$ . Здесь  $\alpha_1$  — величина смещения, обусловленного вкладом функций  $\delta_2(k)$  и  $\eta(k)$  в синусоидальную часть функций  $\chi(k)$ . В данной работе интервал интегрирования задавался в пределах от  $3 \text{ \AA}^{-1}$  до  $7 \text{ \AA}^{-1}$ . К сожалению, максимум зависимости  $\varphi(r)$ , соответствующий рассеянию на определенном атоме окружения, имеет определенную ширину, обусловленную конечностью интервала интегрирования в  $k$ -пространстве, дисперсией величины  $f(k)$  и температурными колебаниями, характеризуемыми величиной  $\sigma_i^2$ . Следовательно, если атомы находятся на расстояниях меньших, чем ширина каждого максимума, то соответствующие пики сольются.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

$L_{III}$ -спектры иона  $Tb^{3+}$  во II и III компонентах парвальбумина приведены на рис. 2; фурье-преобразования, проведенные по формуле (3), приведены на рис. 3. Из рисунка видно, что положения максимумов у

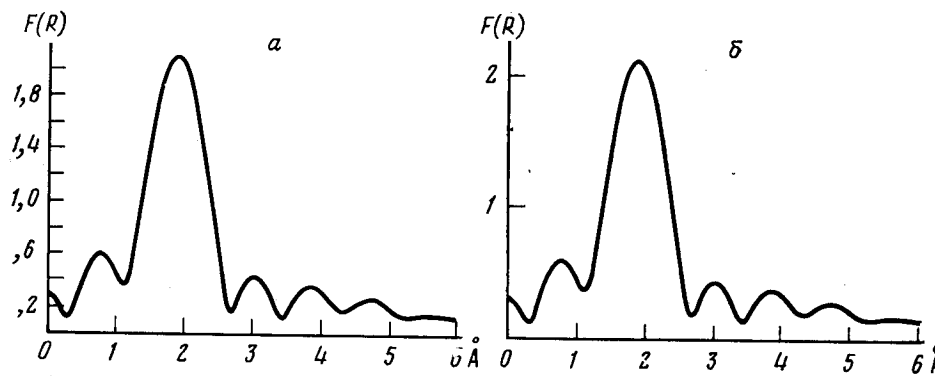


Рис. 3. Модули фурье-преобразования нормированной осциллирующей части рентгеновского спектра поглощения для компонента II (а) и компонента III (б) парвальбумина

двух спектров совпадают, а амплитуды очень близки (величина амплитуды главного максимума одного из спектров отличается от соответствующей величины другого спектра менее, чем на 2%).

Разница в расстояниях Ca—O слишком мала, и мы наблюдаем на рисунке один широкий максимум. Его ширина обусловлена как реальной разницей в межатомных расстояниях, так и уширениями, описанными выше. Сопоставляя спектры и фурье-преобразования II и III компонентов парвальбумина, можно убедиться в их идентичности в спектральном интервале 2—6 Å. Это позволяет сделать заключение о совпадении координационных чисел, средних межатомных расстояний и их дисперсии относительно среднего значения в Ca<sup>2+</sup>-связывающих центрах обоих компонентов белка.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Moews P. C., Kretsinger R. H. *J. Mol. Biol.*, 1975, 91, 201—225.
2. Stern E. A. *Phys. Rev. B*, 1974, 10, 3027—3037.
3. Moews P. C., Kretsinger R. H. *J. Mol. Biol.*, 1975, 91, 229—232.
4. Отчет о работах по использованию синхротронного излучения в ИЯФ СО АН СССР. Новосибирск, 1981, с. 44—47.
5. Peshere J. F., Demaille J., Capony J. P. *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 236, 391—408.
6. Weber K., Osborn M. J. *Biol. Chem.*, 1969, 244, 4406—4412.
7. Konosu S., Hamoir G., Peshere J. F. *Biochem. J.*, 1965, 96, 98—112.
8. Donato H., Martin R. *Biochemistry*, 1974, 13, 4575—4579.

Поступила в редакцию  
1.III.1983

#### INVESTIGATION OF Ca<sup>2+</sup>-BINDING CENTERS OF PARVALBUMIN BY DISTANT FINE STRUCTURE OF X-RAY ABSORPTION SPECTRA

A. A. VAZINA, A. F. KORISTOVA, V. M. SHELESTOV,  
S. E. VERNOSLOV, V. Yu. LUNIN, M. A. KOZLOV, V. L. KRAISMAN

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR,  
Poustchino, Moscow Region  
Institute of Nuclear Physics, Academy of Sciences of the USSR,  
Siberian Branch, Novosibirsk*

An investigation of Ca<sup>2+</sup>-binding centers of parvalbumin II and III by analysing distant fine structure of X-ray absorption spectra of metal was performed. Protein preparations of parvalbumin II and III in which Ca<sup>2+</sup> was isomorphically replaced by Tb<sup>3+</sup> were studied. For spectra analyses a standard method of Fourier transformation was used. The middle of the first absorption maximum was taken as origin for energy calculations. Comparison of spectra and modules of Fourier transformations for normalized oscillations of the X-ray spectra of absorption of the II and III components, revealed that the spectra and Fourier-transformants coincide in the 2—6 Å interval. This allows to infer the coincidence of the coordinate numbers, average interatomic distances and their dispersions in Ca<sup>2+</sup>-binding centers of the two protein components.