

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ
БИОЛОГИЯ**

Том 19

(ОТДЕЛЬНЫЙ ОТТИСК)

6

МОСКВА · 1985

УДК 577.322

**ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ МЕТАЛЛСВЯЗЫВАЮЩИХ
ЦЕНТРОВ КАЛЬМОДУЛИНА МЕТОДОМ
EXAFS-СПЕКТРОСКОПИИ**

A. A. ВАЗИНА, A. F. КОРЫСТОВА, B. M. ШЕЛЕСТОВ, C. E. ВЕРНОСЛОВ*
B. Ю. ЛУНИН*, M. A. КОЗЛОВ, B. L. КРАЙЗМАН*****

Институт биологической физики 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*

государственного университета, Ростов-на-Дону

Проведено исследование связывающих ионы Ca^{2+} центров кальмодулина методом спектроскопии EXAFS. Экспериментальные результаты получены на спектрометре, действующем в Институте ядерной физики СО АН СССР, на препаратах кальмодулина, в которых кальций изоморфно замещался на тербий (Tb^{3+}). Для анализа спектров использовали методику преобразования Фурье. Совпадение главных максимумов на кривых преобразования Фурье спектров кальмодулина и парвальбумина в интервале 2–6 Å дало основание сделать заключение об идентичности связывающих Ca^{2+} центров кальмодулина и парвальбумина.

Многие важнейшие биологические процессы регулируются ионами кальция. Согласно современным представлениям, влияние этого катиона на различные процессы в клетке осуществляется через ряд гомологичных белков, связывающих Ca^{2+} . К ним относятся парвальбумин, тропонин С и кальмодулин — белки с гомологичными первичными структурами и близкими физико-химическими свойствами. Характерная черта аминокислотных последовательностей этих белков — наличие гомологии между отдельными участками полипептидной цепи. Методом рентгеноструктурного анализа определена структура парвальбумина карпа (компонент с рI 4,25) [1]. Оба связывающих Ca^{2+} центра в парвальбумине по модели Кретсингера находятся в карманах между двумя α -спиральными участками, в окружении 5—6 отрицательно заряженных R-групп белка (рис. 1). Ниже приведены величины расстояний (в Å) между ионом кальция и атомом кислорода указанных на рисунке координационных лигандов CD- и EF-петли:

X Ca—O (Asp-90) — 2,87	X Ca—O (Asp-51) — 2,13
Y Ca—O (Asp-92) — 2,48	Y Ca—O (Asp-53) — 2,35
Z Ca—O (Asp-94) — 2,63	Z Ca—O (Ser-55) — 2,42
—Y Ca—O (Lys-96) — 2,19	—Y Ca—O (Phe-57) — 2,30
—X Ca—O (H_2O) — 2,39	—X Ca—O (Glu-59) — 2,60
—Z Ca—O (Glu-101) — 2,44	—Z Ca—O (Glu-62) — 2,31

Пространственные структуры тропонина С и кальмодулина пока не установлены, однако высказано предположение о структурной гомологии связывающих Ca^{2+} центров этих белков [2].

Цель настоящей работы — исследование связывающих Ca^{2+} центров кальмодулина. Кальмодулин — уникальный белок, осуществляющий регуляцию концентрации ионов Ca^{2+} в самых разных процессах: в метаболизме циклических нуклеотидов, в фосфорилировании белков (мембранных, цитоплазматических, мышечных), в регуляции активности самых различных ферментов, в образовании микротрубочек. Этот белок

обнаружен в растительных и животных тканях. Молекулярная масса кальмодулина ~ 17 кДа. Молекула белка специфически связывает четыре иона Ca^{2+} , два с $K=1,3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, два других с $K=1,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$.

В последние годы для исследования активных центров металлокомплексов успешно применяется анализ дальней тонкой структуры рентгеновских спектров поглощения или метод EXAFS-спектроскопии, основанный на измерении модуляции коэффициента поглощения рентгеновского излучения при энергиях на 10^2 — 10^3 эВ выше K -края поглощения исследуемого атома [3]. Анализ позволяет получить информацию о структурных параметрах — определить расстояние от поглощающего атома металла до ближайших атомов.

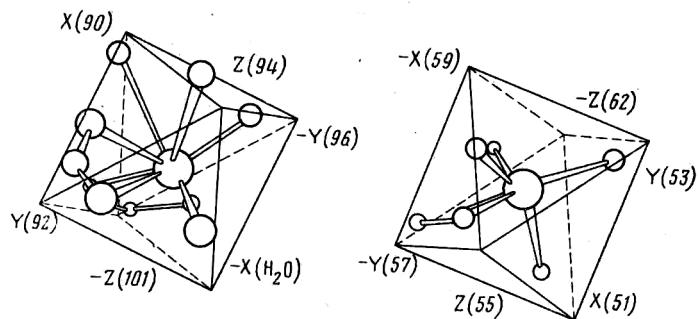


Рис. 1. Координационные сферы иона Ca^{2+} в связывающих кальций центрах парвальбумина (компонент с рН 4,25) [1]. Координационные лиганда CD-петли: Asp-51, Asp-53, Ser-55, Phe-57, Glu-59, Glu-62, координационные лиганда EF-петли: Asp-90, Asp-92, Asp-94, Lys-96, Glu-101. Расстояния $\text{Ca}-\text{O}$ соответствующих групп приведены в таблице

Метод EXAFS используется в исследовании белков, содержащих медь, железо, молибден, никель и другие атомы, у которых энергия K - и L -края спектров поглощения лежит в области, удобной для эксперимента (λ от 1 до 2 Å). Однако для использования этого метода в исследовании белков, содержащих более легкие атомы, например кальция, имеются методические сложности, связанные с тем, что K -край спектра поглощения Ca^{2+} лежит в рентгеновской области $\lambda=3,35$ Å, излучение такой длины волны сильно поглощается. Это обстоятельство удалось преодолеть, используя тот факт, что в связывающих Ca^{2+} белках кальций замещается на тербий с более высокой константой связывания. Кроме того, методом рентгеноструктурного анализа показано, что Ca^{2+} в парвальбумине (рН 4,25) изоморфно замещается на Tb^{3+} [4]. L -Край поглощения тербия лежит в области, удобной для эксперимента.

ТЕХНИКА И УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Использовали спектрометр (Институт ядерной физики СО АН СССР [5]), сравнивающий интенсивности излучения до и после образца. Спектрометр состоит из монохроматора ($\Delta\lambda/\lambda=3 \cdot 10^{-4}$), двух ионизационных камер, измеряющих интенсивность до и после образца, приставки для образца. Спектрометр автоматизирован на основе ЭВМ «ODRA-1325» (Польша). Для монохроматизации излучения в спектрометре использовался двойной моноблочный кристалл германия Ge(III) ($d=3,25$ Å) с расстоянием между поверхностями 3 мм. Кристалл позволяет охватить диапазон длин волн от 0,8 до 3 Å. Выходной пучок при изменении угла падения совершает вертикальные перемещения; при энергии 10 кэВ и сканировании на 1 кэВ перемещение составляет 0,02 мм. Ионизационная камера, измеряющая интенсивность излучения до образца, заполнена смесью 10% Ar + 90% He при атмосферном давлении и имеет эффективность $\sim 10\%$ в области L_{III} -края поглощения Tb. Вторая ионизационная камера, служащая для измерения интенсивности пучка, прошед-

шего через образец, заполнена Хе при атмосферном давлении и имеет 100%-ную эффективность. Образцы в виде порошков равномерно размещали в кюветах и устанавливали их на столик, который можно перемещать по вертикали. Кюветы представляют собой герметические металлические формы с лавсановыми окнами (~ 15 мк). Спектры выводили на дисплей, что позволяло оперативно управлять ходом их накопления. Время накопления спектров составляло 10—20 мин. Полученные спектры формировались в виде файлов, содержащих массив данных и поясняющую информацию на магнитном диске. Программа позволяла переписывать эту информацию для длительного хранения на магнитные ленты. Спектры впоследствии могли быть выведены на экран дисплея, на цифропечатающее устройство DZM-180 (ПНР) в виде графиков и таблиц. Спектрометр позволял получать спектры удовлетворительного качества от образцов, содержащих до 1—2% по весу примеси тяжелого элемента в легкой матрице.

ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКА И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Кальмодулин выделяли из мозга быка по методу Муаллема и Карлиша [6], предложенному ранее для выделения из эритроцитов крови. Чистоту препарата контролировали электрофорезом в 10%-ном поликариламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [7]. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, используя $E_{1\text{cm},270}^{1\%} = 1,83$ [8].

Для замещения Ca^{2+} на Tb^{3+} использовали раствор TbCl_3 , полученный реакцией $\text{Tb}_2(\text{CO}_3)_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ с соляной кислотой. Белок (10^{-3} — 10^{-4} М) титровали Tb^{3+} при рН 6,5 в 2 мМ буфере HEPES [9], лиофильно высушивали и тщательно растирали.

Обработку EXAFS-спектров кальмодулина осуществляли следующим образом. По начальному участку спектра $\mu(\lambda)$ по методу наименьших квадратов искали фон в виде $\Phi(\lambda) = A\lambda^4 + B\lambda^3$, где λ — длина волны рентгеновых лучей. Для разности $\tilde{\mu}(k) = \mu(k) - \Phi(k)$ по методу наименьших квадратов строили гладкую усредняющую функцию $\mu_0(k)$ в виде многочлена третьей степени. Здесь k — модуль волнового вектора электронов, связанный с энергией рентгеновского пучка E соотношением $k = [2m/\hbar^2(E - E_0)]^{1/2}$. В качестве E_0 использовали табличное значение энергии L_{III} -края поглощения тербия, равное 7,535 кэВ, причем на спектре соответствующую точку брали на середине подъема края поглощения. Осциллирующую часть коэффициента поглощения функции $\chi(k)$ определяли по формуле [10]

$$\chi(k) = \frac{\tilde{\mu}(k) - \mu_0(k)}{\mu_0(k)}, \quad (1)$$

где μ_0 — коэффициент поглощения в отсутствие соседних атомов. Зависимость χ от волнового числа «выбитого» электрона дается соотношением [10]:

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

где R_i — расстояние от поглощающего атома до рассеивающего, $f_i(\pi)$ — модуль амплитуды рассеяния фотоэлектрона назад, δ_2 — парциальный сдвиг фазы рассеяния на центральном атоме с $l=2$, η_i — сдвиг фазы фотоэлектронной волны при рассеянии на ближайшем атоме, σ^2 — среднеквадратичное смещение атома из положения равновесия.

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

этого преобразование Фурье функции $\chi(k)$, проведенное по формуле

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

позволяет выделить максимум, соответствующий первой координационной сфере окружения, при $r=R_1-\alpha_1$. Здесь α_1 — величина смещения, обусловленного вкладом функций $\delta_2(k)$ и $\eta_i(k)$ в синусоидальную часть функций $\chi(k)$. В данной работе интервал интегрирования задавался в пределах от 3 до 7 \AA^{-1} . К сожалению, максимум функции $\varphi(r)$, соответствующий рассеянию на определенном атоме окружения, имеет определенную ширину, обусловленную конечностью интервала интегрирования в k -пространстве, дисперсией величины $f_i(k)$ и температурными колебаниями, характеризуемыми величиной σ_i^2 . Следовательно, если атомы находятся на расстояниях меньших, чем ширина каждого максимума, то соответствующие пики сольются.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальный L_{III} -спектр Tb^{3+} в кальмодулине изображен на рис. 2, а. На рис. 2, б приведено преобразование Фурье спектра. Для сравнения на этом же рисунке приведен модуль преобразования Фурье нормированной осциллирующей части рентгеновского спектра поглоще-

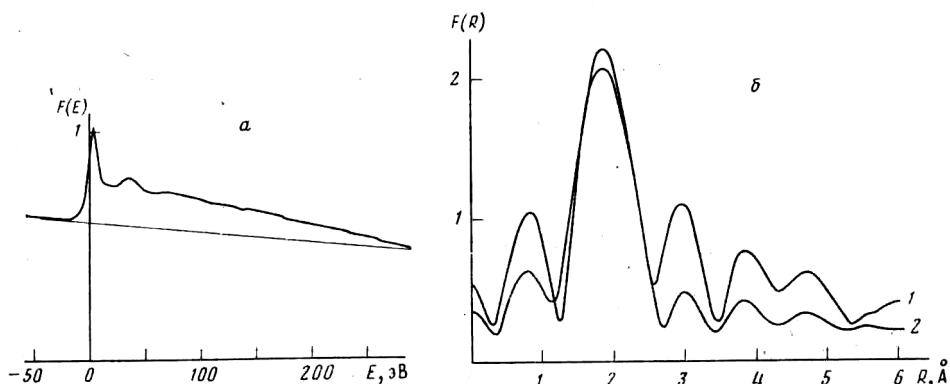


Рис. 2. а — Экспериментальный спектр L_{III} Tb^{3+} в кальмодулине в зависимости от кинетической энергии фотоэлектрона E_Φ . б — Модули преобразования Фурье нормированной осциллирующей части гентгеновского спектра поглощения для кальмодулина (1) и парвальбумина (2) (компонент с рI 4,25)

ния парвальбумина (компонент с рI 4,25) [11]. Разница в расстояниях $\text{Ca}-\text{O}$ мала, и мы наблюдаем на рисунке один широкий максимум. Как было показано ранее [12], при сравнении положения максимума для Tb_2O_3 ($1,88 \text{ \AA}$) и среднего расстояния $\text{Tb}-\text{O}$ в этом соединении ($2,31 \text{ \AA}$) положение максимума сдвигается на $0,43 \text{ \AA}$. Используя гипотезу о независимости величины сдвига от химического состояния атомов тербия и кислорода, среднее расстояние $\text{Tb}-\text{O}$ для парвальбумина (компонент с рI 4,25) и кальмодулина составило $2,41 \pm 0,02 \text{ \AA}$. Идентичность кривых преобразования Фурье обоих белков в спектральном интервале $2-6 \text{ \AA}$ и совпадение главных максимумов дало основание заключить, что совпадают средние межатомные расстояния и координационные числа, и сделать вывод о том, что связывающие Ca^{2+} центры парвальбумина и кальмодулина идентичны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Moews P. C., Kretsinger R. H. J. Mol. Biol., 1975, 91, 201—225.
2. Kretsinger R. H. Critical reviews in biochemistry: structure and evolution of calcium-modulated proteins. Cleveland: CRC Press, 1980, p. 119—174.
3. Stern E. A. Physical Reviews B, 1974, 10, 3027—3037.
4. Moews P. C., Kretsinger R. H. J. Mol. Biol., 1975, 91, 229—232.

5. Отчет о работах по использованию синхротронного излучения в ИЯФ СО АН ССР. Новосибирск, 1981, с. 44—47.
6. Mualem S., Karlish S. F. FEBS Lett., 1979, *107*, 209—212.
7. Weber K., Osborn M. J. Biol. Chem., 1969, *244*, 4406—4412.
8. Цалкова Т. Н., Привалов П. Л. Молекуляр. биология, 1983, *17*, 314—321.
9. Donato H., Martin R. Biochemistry, 1974, *13*, 4575—4579.
10. Sayers D. E., Stern E. A., Lytle F. W. Physical Reviews B, 1975, *11*, 4836—4842.
11. Вазина А. А., Корыстова А. Ф., Шелестов В. М., Вернослов С. Е., Лунин В. Ю., Козлов М. А., Крайзман В. Л. Молекуляр. биология, 1984, *18*, 681—684.
12. EXAFS-спектроскопия с использованием синхротронного излучения накопителя ВЭПП-3. Новосибирск: Препринт ИЯФ СО АН ССР, 1983, с. 49—50.

Поступила в редакцию
20.XI.1984:

INVESTIGATION OF THE STRUCTURE OF CALMODULIN METAL-BINDING CENTERS BY EXAFS-SPECTROSCOPY

*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 Catalysis, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR,
Novosibirsk*

***Scientific Computer Centre, Academy of Sciences of the USSR,
Poustchino, Moscow Region*

**** Research Institute of Physics of Rostov State University, Rostov-on-Don*

An investigation of Ca^{2+} -binding centers of calmodulin was carried out by EXAFS-spectroscopy. The experimental results for protein preparations of calmodulin in which Ca^{2+} was isomorphically replaced by Tb^{3+} were obtained by a spectrometer working at the Institute of Nuclear Physics. For spectra analyses a standard method of Fourier transformation was used. Coincidence main maxima on $\varphi(r)$ curves and identity of Fourier transformation for calmodulin and parvalbumin in the 2—6 Å interval allow to infer the identity of Ca^{2+} -binding centers of calmodulin and parvalbumin.