



УДК 543.422.23

ИЗУЧЕНИЕ КОНФОРМАЦИИ БЕЛКА S16 РИБОСОМ
ESCHERICHIA COLI МЕТОДОМ ПРОТОННОГО
МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

Бушцев В. Н., Сепетов Н. Ф.

Институт биологической физики Академии наук СССР, Пущино

Гогия З. В., Седелникова С. Э.

Институт белка Академии наук СССР, Пущино

Сибельдина Л. А.

Институт химической физики Академии наук СССР, Москва

Методом ^1H -ЯМР в $^2\text{H}_2\text{O}$ исследован белок S16 из 30S субчастицы рибосом *Escherichia coli*. Показано, что молекула белка при pH 6–8,8 имеет глобулярную структуру. Переход из упорядоченного глобулярного состояния молекулы S16 в развернутое состояние при наличии в растворе белка мочевины можно представить схемой двухпозиционного обмена. При pH < 5,5 происходит изменение конформации белка, связанное с потерей глобулярной структуры. При pH < 4 молекула белка S16 глобулярной структуры не имеет.

Белок S16 входит в состав малой или 30S субчастицы рибосом *Escherichia coli* [1]. Его полипептидная цепь состоит из 82 аминокислотных остатков [2]. Согласно результатам нейтронного рассеяния [3], ядерного магнитного резонанса [4] и данным кругового дихроизма [5], он имеет глобулярную структуру с высоким содержанием упорядоченной вторичной структуры.

Структурные особенности белка S16 в растворе при различных изменениях условий среды мы изучали с помощью метода протонного магнитного резонанса ^1H -ЯМР, который дает информацию о динамике и деталях структуры белков в растворе [6]. Проведенное исследование подтвердило, что белок S16 имеет в растворе компактную глобулярную структуру. Изучение процесса денатурации белка мочевиной показало наличие обмена между свернутым и денатурированным состоянием белка.

Полипептидная цепь белка S16 содержит 82 аминокислотных остатка, в том числе два гистидина в положениях 9 и 59, один тирозин-17, один триптофан-60 и четыре фенилаланина в положениях 16, 32, 38, 39 [2]. Ароматическая и алифатическая области спектра ^1H -ЯМР белка S16 в неденатурирующих условиях и в присутствии различных концентраций мочевины в растворе белка показаны на рис. 1.

Спектр ^1H -ЯМР белка S16 содержит большое число сигналов с химическими сдвигами в сильном поле в области от 0,8 до $-0,53$ м.д., которых

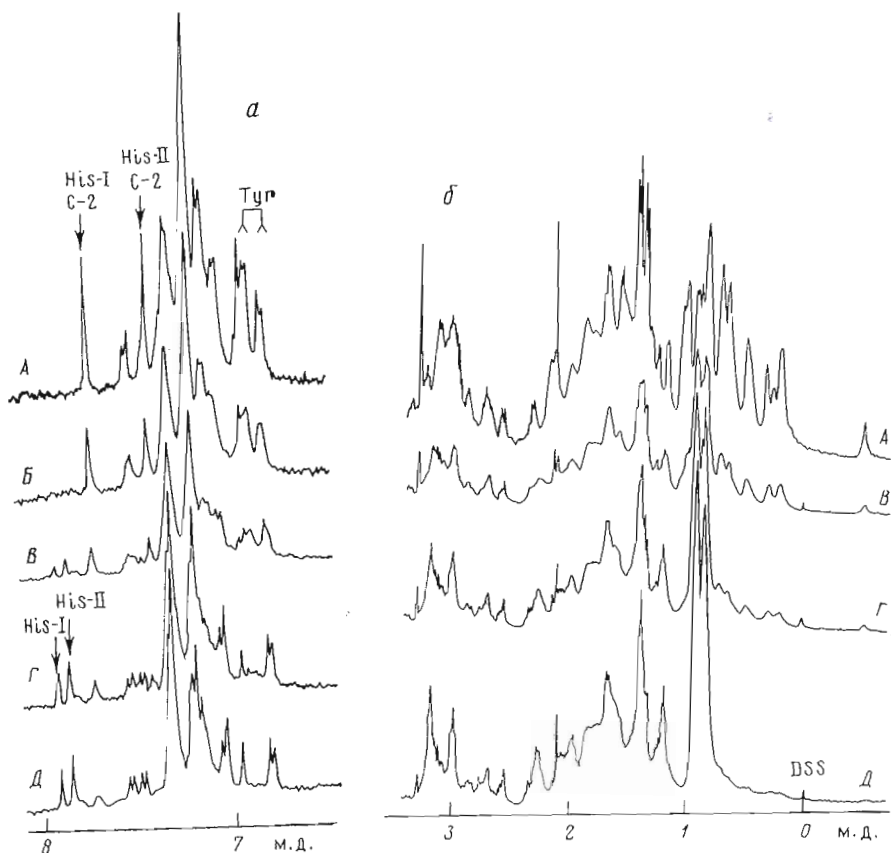


Рис. 1. Спектр ПМР в области 6,5—8,5 м.д. (а) и -0,53—3,5 м.д. (б) белка S16 при различных концентрациях мочевины, рН 6,7 (М): А — без мочевины; В — 2; В — 3; Г — 4; Д — 5

нет в спектрах индивидуальных аминокислот и денатурированного мочевиной белка [6, 7]. Это свидетельствует о существовании фиксированной пространственной структуры молекулы S16 в растворе. Сигналы в наиболее сильном поле обычно относят к протонам метильных и метиленовых групп алифатических аминокислотных остатков, сдвиг которых в несколько более сильное поле обусловлен, как правило, кольцевыми токами ароматических остатков, находящимися в непосредственной близости к этим группам [7, 8]. Интегральная интенсивность сигналов в области от 0,8 до -0,53 м.д. соответствует более чем 60 протонам. Это позволяет полагать, что большое число алифатических аминокислотных остатков молекулы S16 участвует в формировании глобулярной структуры в растворе.

В районе спектра ПМР белка от 6,5 до 8,0 м.д. содержатся сигналы протонов боковых радикалов только ароматических остатков: четырех фенилаланинов, триптофана, тирозина и двух остатков гистидинов. Синглетные сигналы при 7,72 и 7,41 м.д. интенсивностью в один протон каждый мы отнесли к С2-протонам имидазольного кольца двух аминокислотных остатков гистидинов на основании их характерного сдвига в низкое поле при уменьшении значения рН раствора (рис. 2). Два дублетных сигнала при 6,88 и 6,80 м.д. интенсивностью в два протона каждый, с расщеплением, близким к 8 Гц, сдвигаются в высокое поле в области изменения значения рН раствора от 6,7 до 8,8 на 0,14 и 0,24 м.д. При облучении дублетного сигнала при 6,80 м. д. дублетный сигнал при 6,88 м.д. сливается в синглетный (спектр не представлен). Следовательно, эти дублеты являются спин-связанными и относятся к протонам боковой цепи единствен-

Рис. 2. Зависимость химических сдвигов сигналов С2 протонов гистидиновых остатков от рН раствора

Рис. 3. Область спектра ПМР от 1,0 до -0,53 м.д. белка S16 при различных значениях рН раствора: А - 8,8; Б - 6,4; В - 5,1; Г - 4,2; Д - 3,8

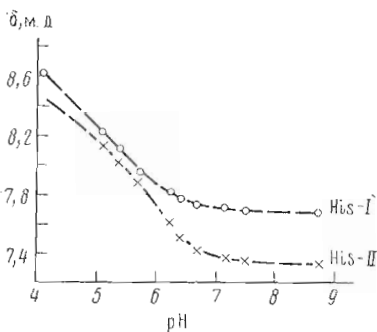


Рис. 2

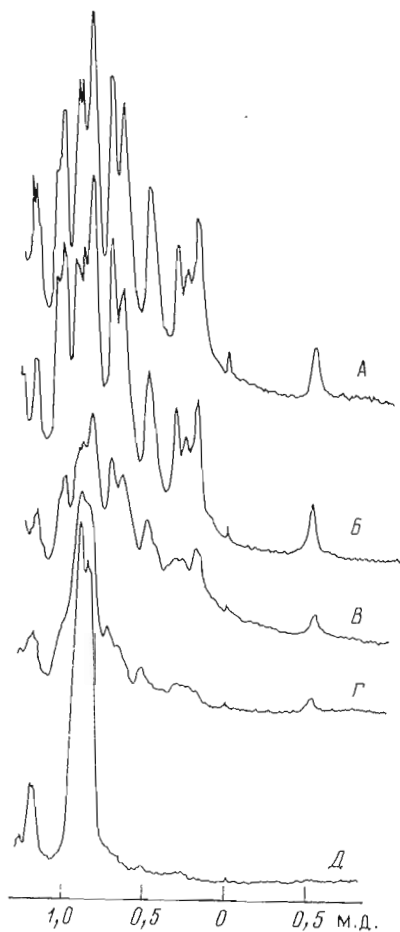


Рис. 3

ного в белке тирозина. Большой сдвиг высокопольного дублета при увеличении рН раствора по сравнению с более низкопольным позволяет отнести высокопольный дублет при 6,80 м.д. к С3- и С5-протонам, а дублет при 6,88 м.д. — к С2- и С6-протонам кольца тирозина -17 [6, 9].

Значительная разница химических сдвигов сигналов протонов ароматических остатков (особенно гистидинов и тирозина) в спектре нативного белка (рис. 1 А) по сравнению со спектром белка в 5М мочевины (рис. 1 Д) подтверждает сделанный вывод о глобулярной структуре молекулы S16.

Влияние рН раствора на структуру белка S16. Из рис. 3 видно, что при рН < 6 интенсивность сигналов с аномально высоким экранированием, которые характеризуют компактную глобулярную структуру молекулы белка S16, в спектре уменьшается и возрастает интенсивность сигнала с центром при 0,9 м.д., характерного для положения сигналов протонов метильных групп алифатических остатков в развернутом состоянии белка [7]. Из этих данных следует, что при рН < 4,0 белок полностью теряет компактную глобулярную структуру.

Денатурация белка мочевиной. Как следует из сравнения спектров белка S16 при различных концентрациях мочевины (при постоянном рН) в растворе (рис. 1), в 5 М растворе мочевины белок S16 находится в развернутом состоянии. Об этом свидетельствует практически полное отсутствие сигналов в области от 0,80 до -0,53 м.д. При концентрации мочеви-

ты в растворе >2 М интенсивность сигналов при 7,71 и 7,41 м.д. от протонов при С2 обоих остатков гистидинов уменьшается и появляются новые сигналы в более низком поле при 7,91 и 7,85 м.д., интенсивность которых возрастает с увеличением концентрации мочевины (рис. 1).

Сигналы при 6,88 и 6,80 м.д., относящиеся к протонам С2,6 и С3,5 тирозина, в присутствии 2 М мочевины более широкие, чем в отсутствие мочевины.

При более высоких концентрациях мочевины в растворе в спектре появляется дублетный сигнал при 7,09 м.д., а интенсивность сигнала при С2,6 тирозина (6,88 м.д.) уменьшается; при концентрации мочевины >4 М он полностью исчезает. Дублетный сигнал при 7,09 м.д. может быть отнесен к протонам при С2,6 тирозина, поскольку его химический сдвиг соответствует сигналу от С2,6 тирозина в денатурированном белке [6, 7].

Одновременное наблюдение отдельных и довольно узких сигналов от протонов гистидиновых и тирозиновых остатков для глобулярного и развернутого состояний белка показывает, что остатки гистидинов и тирозина находятся по крайней мере в двух состояниях, между которыми при 25° С происходит медленный обмен во временной шкале ЯМР [10, 11]. Интенсивность синглетного сигнала при 2,13 м.д., который может быть отнесен к протонам метильной группы единственного остатка метионина, в процессе денатурации белка уменьшается (рис. 1 А) и исчезает в спектре белка в 5 М мочевины (рис. 1 Г). В то же время появляется синглетный сигнал при 2,10 м.д., интенсивность которого возрастает при разворачивании структуры белка. Добавление в раствор мочевины также приводит к уменьшению интенсивности и небольшому увеличению ширины сигналов протонов алифатических остатков (область от $-0,53$ до $0,8$ м.д.) и возрастанию величины сигнала с центром при $0,9$ м.д., который соответствует положению сигналов метильных протонов алифатических остатков в развернутом белке.

Из этих данных следует, что в процессе денатурации белка мочевиной одновременно присутствует как глобулярное, так и развернутое состояние, между которыми происходит обмен. Конформационное равновесие между глобулярным и развернутым состоянием наблюдается уже в присутствии в растворе белка 2 М мочевины. С повышением концентрации мочевины (более 3 М) равновесие сдвигается в сторону развернутого состояния.

Экспериментальная часть

Спектры ПМР получены на спектрометре WH-360 (Bruker) в импульсном режиме с последующим фурье-преобразованием. Длительность импульса 8 мкс, время одного цикла 1,4 с. Химические сдвиги измерены относительно внутреннего эталона 2,2-диметил-2-силапентан сульфоната натрия (DSS). Спектры сняты в стандартных 5-мм ампулах с концентрацией белка 1–4 мг/мл при 25° С.

Рибосомный белок S16 был выделен из 30S субчастицы рибосом *E. coli* MRE-600 4 М мочевиной с 3 М LiCl и очищен хроматографией на фосфоцеллюлозе в присутствии 6 М мочевины [12]. Для получения спектров ЯМР белок S16 был переведен в буфер, pH 6,7, содержащий $^2\text{H}_2\text{O}$, 30 мМ Na-фосфат и 100 мМ NaCl (значение pH раствора соответствует показанию pH-метра без введения поправки на изотопное замещение).

Авторы выражают благодарность акад. А. С. Спирину за полезные замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stöffler G., Wittmann H. G. Molecular mechanisms of protein biosynthesis / Eds Weissbach H., Pestka S. London — New York: Acad. Press, 1977, p. 117–209.
2. Vandekerckhove I., Rombauts W., Wittmann-Liebold B. The primary structure of protein S16 from *Escherichia coli* ribosomes. — FEBS Lett., 1977, v. 73, № 1, p. 18–21.

3. Serdyuk I. N., Zaccai G., Spirin A. S. Globular conformation of some ribosomal proteins in solution.— FEBS Lett., 1978, v. 94, № 2, p. 349–352.
4. Littlechild J. Proton magnetic resonance studies of *Escherichia coli* ribosomal protein S16.— FEBS Lett., 1980, v. 111, № 1, p. 51–55.
5. Веньяминов С. Ю., Гогия З. В. Вторичная структура РНК-связывающих белков из малой субчастицы рибосом *Escherichia coli*.— Докл. АН СССР, 1980, т. 252, № 3, с. 758–760.
6. Wüthrich K. NMR in biological research: peptides and proteins. Amsterdam, North Holland, 1976.
7. McDonald C. C., Phillips W. D. Proton magnetic resonance spectra of proteins in random-coil configurations.— J. Amer. Chem. Soc., 1969, v. 91, № 4, p. 1513–1521.
8. Sternlicht H., Wilson D. Magnetic resonance studies of macromolecules. I. Aromatic-methyl interactions and helical structure effects in lysozyme.— Biochemistry, 1967, v. 6, № 9, p. 2881–2892.
9. Roberts G. C. K., Jardetzky O. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of amino acids, peptides and proteins.— Adv. Prot. Chem., 1970, v. 24, p. 447–545.
10. McDonald C. C., Phillips W. D., Glikson J. D. Nuclear magnetic resonance study of the mechanism of reversible denaturation of lysozyme.— J. Amer. Chem. Soc., 1971, v. 93, № 1, p. 235–246.
11. Benz F. W., Roberts G. C. K. Nuclear magnetic resonance studies of the unfolding of pancreatic ribonuclease. II. Unfolding by urea and Guanidine hydrochloride.— J. Mol. Biol., 1975, v. 91, № 2, p. 367–387.
12. Hardy S. J. S., Kurland C. G., Voynow P., Mora G. The ribosomal proteins of *Escherichia coli*. I. Purification of the 30S ribosomal proteins.— Biochemistry, 1969, v. 8, № 10, p. 2897–2905.

Поступила в редакцию
4.V.1981
После доработки
18.VI.1981

STUDIES OF THE CONFORMATION OF PROTEIN S16 FROM *ESCHERICHIA COLI* RIBOSOMES BY PROTON MAGNETIC RESONANCE

BUSHUEV V. N., SEPETOV N. F., GOGIA Z. V., SEDELNIKOVA S. E.,
‡ SIBELDINA L. A.

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

Protein S16 from the 30S subparticle of *Escherichia coli* ribosomes has been studied by ^1H NMR in $^2\text{H}_2\text{O}$. It has been shown that the protein molecule has a globular structure. The transition from the ordered globular state into the disordered state in the presence of urea can be represented by the scheme of a two-position exchange. A decrease in pH value to lower than 5.5 leads to significant conformational changes and disruption of the globular structure.