

Об использовании спиновых меток для исследования мембранных белков методом высокочастотного двойного электрон-ядерного резонанса

С. Б. Орлинский¹⁾²⁾*, И. В. Боровых^{2)†}, В. Цильке^{2)†}, Х.-Ю. Штейнхоф^{2)†}

Казанский государственный университет, 420008 Казань, Россия

*Huygens Laboratory, Department of Physics, Leiden University, 2300RA Leiden, The Netherlands

†Fachbereich Physik, Universitaet Osnabrueck, D-49076 Osnabrueck, Germany

‡Laboratory of Biophysics, Wageningen University, 6703HA Wageningen, The Netherlands

Поступила в редакцию 31 мая 2007 г.

Показана возможность применения спиновых меток для исследования мембранных белков методом высокочастотного двойного электрон-ядерного резонанса. На примере встроенного в липидную мембрану бактериородопсина зарегистрированы спектры протонов близко расположенных аминокислот, обнаружены градиенты электрического поля на поверхности мембраны, измерена константа сверхтонкого взаимодействия с ядром хлора в месте ионного захвата.

PACS: 76.70.Dx , 87.16.Dg

В настоящей работе на примере спин-меченого бактериородопсина (БР) из *Halobacterium salinarum* (*H. salinarum*) показано, что мембранные белки можно исследовать методом высокочастотного (94.9 ГГц) двойного электрон-ядерного резонанса (ДЭЯР). Число белков, содержащих собственные парамагнитные центры, составляет около 1% от всех известных. В связи с этим была разработана методика внедрения спиновых меток для создания парамагнитных центров в заданных позициях в структуре белка. Она широко используется для получения информации о динамике белков [1, 2]. При этом применяются различные варианты спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), в предположении значительной локализации неспаренного электрона в районе N-O-связи. Нитроксильные спиновые метки являются стабильными органическими свободными радикалами с электронным спином $S = 1/2$. В настоящей работе использовались 1-оксил-2,2,5,5-тетраметилпилолин-3-метилметантиосульфат спиновые метки (МТССМ) [3]. Мутации цистеинов в заданных позициях в структуре БР производились согласно процедуре, описанной в [4]. Мутированные белки выделялись как полосы пурпурной мембраны, следуя протоколу, описанному в [5]. Внедрение спиновых меток в БР описано в работе [6].

Спектры ЭПР МТССМ, расположенных в различных позициях в структуре БР, были изучены в работах [7, 8]. Низкочастотный ДЭЯР ранее применялся для изучения в основном свободных спиновых меток, не связанных с белком или связанных с небольшими молекулами [9–12]. Недавно мы показали, что даже при малой плотности волновой функции неспаренного электрона на окружающих ядрах можно регистрировать сверхтонкие взаимодействия с ними, благодаря большой чувствительности и селективности высокочастотного ДЭЯР [13–15]. Все эксперименты проводились на импульсном спектрометре ЭПР, описанном ранее [16], с частотой наблюдения 94.9 ГГц при температуре образцов 1.6 К. Спектры ЭПР регистрировались по амплитуде первичного эха при сканировании магнитного поля. Для измерения спектров ДЭЯР использовалась стандартная импульсная последовательность Мимса [17].

Спектр ЭПР МТССМ, находящийся в 162 аминокислотной позиции БР, показан на рис. 1а. Метка ориентирована практически перпендикулярно к поверхности мембраны, в которую встроена БР, как показано в работе [8]. Наблюдается характерный спектр ЭПР замороженного раствора, где видна разрешенная тонкая структура. Особые точки этой структуры соответствуют каноническим ориентациям g -тензора спиновой метки и обозначены на рис. 1а как g_{xx} , g_{yy} , g_{zz} . В дополнение к этому наблюдается разрешенная сверхтонкая структура, которая возникает из-за взаимодействия неспаренного электрона с ядром ^{14}N

¹⁾e-mail: Sergei.Orlinskii@ksu.ru

²⁾S. B. Orlinskii, I. V. Borovykh, V. Zielke, H.-J. Steinhoff.

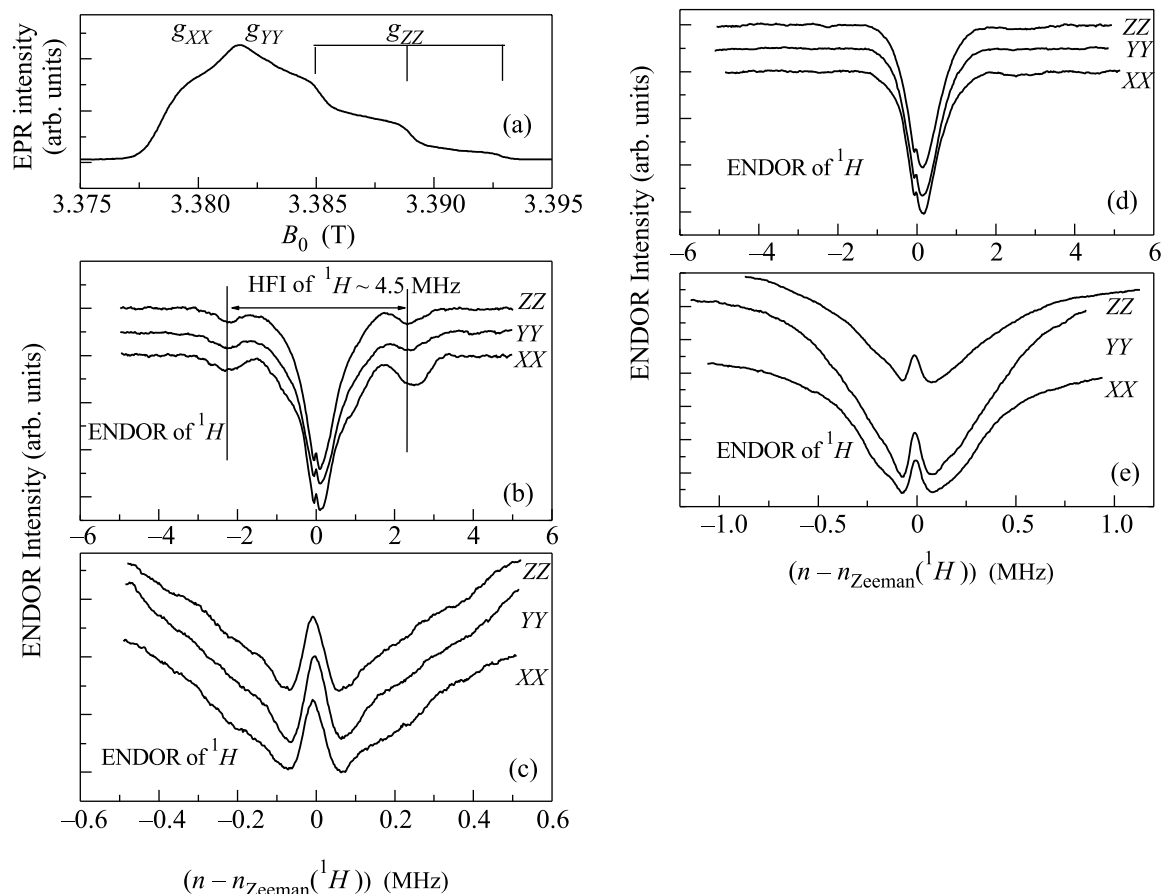


Рис.1. (а) Спектр ЭПР, протонированной МТССМ, находящейся в 162 позиции БР, стандартный фосфатный буфер ($pH=7$) с концентрацией 100 мМ NaCl. (б) Показаны спектры ДЭЯР протонов этого образца. Обозначена на рисунке величина изотропного сверхтонкого взаимодействия (HFI) неспаренного электрона с ближайшими протонами. (с) Те же самые измерения, что и в (б), только проведенные с большим разрешением. (d) Показаны спектры ДЭЯР протонов для образца с дейтерированной МТССМ, находящейся в 162 позиции БР. (е) Те же самые измерения, что и в (d), только проведенные с большим разрешением

с ядерным спином $I = 1$ для меток, чьи z -оси g -тензора ориентированы вдоль внешнего магнитного поля.

На рис.1б,с показаны спектры ДЭЯР протонов, измеренные в магнитных полях, примерно соответствующих каноническим ориентациям g -тензора xx , yy и первой, низкопольной, линии zz . Плотность волновой функции неспаренного электрона метки отличается от нуля и на достаточном удалении от ядерного остова спиновой метки. Для доказательства возможности ее измерения на магнитных ядрах белка были выполнены измерения ДЭЯР протонов на аналогичном образце, где МТССМ находится в той же 162 позиции, но все протоны метки заменены на дейтроны. Эти результаты представлены на рис.1d,е. Для большей наглядности центральные части спектров ДЭЯР протонов были измерены более подробно в обоих случаях и представлены отдельно на рис.1с,е.

На рис.2а приведен спектр ЭПР дейтерированной МТССМ, находящейся в 162 позиции БР. На рис.2б показаны спектры ДЭЯР дейтронов, измеренные в магнитных полях, примерно соответствующих каноническим ориентациям g -тензора xx , yy и первой, низкопольной, линии zz . Расстояния до ядер и их число должно остаться теми же, а изменится только их магнитный момент и спин. В этом случае отношение величин сверхтонкого взаимодействия с протонами и дейтронами, находящихся в подобных структурных позициях, должно равняться отношению их магнитных моментов 6.5. На рис.1б и рис.2б отмечены величины сверхтонкого взаимодействия для сильно взаимодействующих ядер, их отношение равно $4.5/0.68 = 6.6$. Из этого можно сделать вывод об идентичности их структурных позиций. Поэтому наблюдаемая анизотропия в спектрах ДЭЯР дейтронов не может быть объяснена анизотропией сверхтонкого взаимодействия, так как она отсутствует в

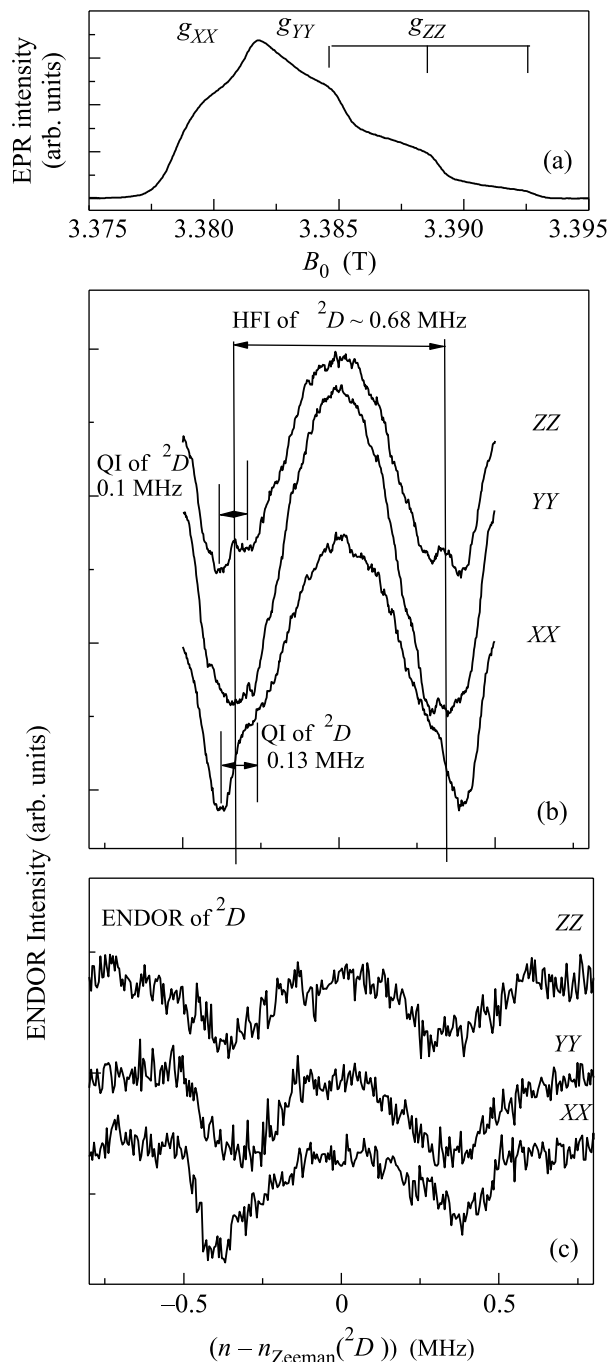


Рис.2. (а) Спектр ЭПР, дейтерированной МТССМ, находящейся в 162 позиции БР, стандартный фосфатный буфер ($pH=7$) с концентрацией 3 М NaCl. Обозначены на рисунке: величина изотропного сверхтонкого взаимодействия (HFI) неспаренного электрона с дейтронами; величины квадрупольного взаимодействия (QI) дейтронов с градиентами электрического поля для двух ориентаций. (с) Показаны спектры ДЭЯР дейтронов для образца, где дейтерированная МТССМ соединена с цистеином

спектрах ДЭЯР протонов, представленных на рис.1б. Так как спин дейтрона $I = 1$, это дополнительное

расщепление можно объяснить квадрупольным взаимодействием, вызванным наличием градиентов электрического поля на поверхности мембраны, в которую встроена БР. Для проверки этого предположения можно МТССМ удалить от мембраны в буферную жидкость, при тех же условиях эксперимента разрешенная анизотропная структура, обусловленная квадрупольным взаимодействием, исчезает. Такие условия можно смоделировать, присоединив МТССМ к цистеину и поместив ее в ту же буферную жидкость ($pH = 7$) с концентрацией 100 мМ NaCl. Спектры ДЭЯР дейтронов, измеренные для такой спиновой метки в магнитных полях, примерно соответствующих каноническим ориентациям g -тензора xx , yy и первой, низкопольной, линии zz , представлены на рис.2с.

Измерена константа сверхтонкого взаимодействия неспаренного электрона протонированной МТССМ, расположенной в 158 позиции БР, с ядром изотопа ${}^{35}\text{Cl}$, находящемся в месте ионного захвата. Ее величина составляет около 600 кГц, что значительно больше, чем можно было бы ожидать около 100 кГц, исходя из величины константы сверхтонкого взаимодействия с ближайшими протонами белка (около 1 МГц, смотри рис.1д), поделенной на отношение магнитных моментов протона и ядра ${}^{35}\text{Cl}$ (приблизительно 10). Такую, относительно высокую, плотность волновой функции неспаренного электрона спиновой метки на ядре хлора можно объяснить наличием слабой связи, типа водородной, между NO группой и атомом хлора.

Наличие квадрупольного взаимодействия и его анизотропию можно использовать для измерения электрических потенциалов и их изменений, возникающих в мембранах под действием внешних факторов, таких как рН, наличия солей или возникающих в процессе функционирования белка. Кроме того, аналогичные измерения можно проводить и для белков, содержащих большое количество полярных аминокислот. Очень часто именно наличие градиента электрических полей и его изменения связаны с функциональной активностью белка. Например, БР является протонным насосом, который активируется светом, вызывающим изомеризацию ретинола и, как следствие, изменение локальных полей вблизи этого кофактора.

В природе *H. salinarum* живет в условиях высокой концентрации хлорида натрия (близкой к насыщению, около 4-4.5 М). Чтобы объяснить наличие места связывания для иона хлора вблизи позиции 158 обратимся к структуре бактериородопсина. Ее анализ позволяет допустить 3 возможных места свя-

зывания, а именно: аминокислоты лизин 159, аргинин 175 и лизин 172, имеющих положительный заряд. Кроме того, мы не можем исключить глицин 155, который тоже имеет положительный заряд и находится в белковой матрице. Наиболее вероятным кандидатом является лизин 159, так как при определенной ориентации хвоста спиновой метки, NO группа может находиться в пептидном кармане на расстоянии 4.5–6 Å. При этой ориентации расстояние до других кандидатов превышает 10 Å, делая их менее вероятными. Для получения более точной информации о месте связывания необходимо провести дополнительные измерения со спиновыми метками, прикрепленными вблизи аминокислоты 158, например 157, и 159 позициями.

Настоящая работа открывает новое направление в исследованиях белков методами высокочастотного ДЭЯР. При этом можно использовать широкий набор уже имеющихся образцов, синтезированных для изучения методами ЭПР. Измерение ДЭЯР на белках со спиновыми метками, расположенными около функционально важных позиций, несомненно, увеличит информативность метода. Также представляется интересным тестирование других, как уже известных, так и синтезированных специально, спиновых меток с меньшей локализацией неспаренного электрона для увеличения чувствительности ДЭЯР.

Подводя итоги, заметим, что в данной работе стандартные спиновые метки использовались для исследования белков методами высокочастотного двойного электрон-ядерного резонанса. Показано, что метод высокочастотного ДЭЯР протонов позволяет измерять малые плотности волновой функции неспаренного электрона спиновой метки и на относительно больших расстояниях от ее ядерного остова. Предложенный метод исследования градиентов электрического поля как на поверхности белков, так и на поверхности включающих эти белки мембран, основанный на измерении анизотропии квадрупольного взаимодействия дейтронов МТССМ, является на данный момент единственным для изучения такого рода явлений. Чувствительность высокочастотного ДЭЯР открывает новые возможности для определения и изучения мест ионного связывания, при этом отсутствие информации о структуре белка не является препятствием. Этот факт является очень важным, так как уже хорошо известно, что функциони-

рование белков (в особенности транспортных и сигнальных) непосредственно связано с ионным балансом окружающей среды.

Работа поддержана поддержана грантом Volkswagenstiftung #I/78668, С.Б.О. благодарен за поддержку Российского фонда фундаментальных исследований, грант # 07-04-00746-а. Авторы благодарны Э.Я.Я. Гронену за полезную дискуссию.

1. O. Y. Grinberg, L. J. Berliner (Eds.), *Biological Magnetic Resonance*, V. 22, Very High Frequency (VHF) ESR/EPR, Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York, 2004.
2. L. J. Berliner (Ed.), *Spin labeling: Theory and Applications*, New York: Academic Press 1976.
3. H.-J. Steinhoff, *EPR newsletters* **15**, 17 (2005).
4. E. Ferrando, U. Schweiger, and D. Oesterhelt, *Gene* **125**, 41(1993).
5. D. Oesterhelt and W. Stoeckenius, *Methods Enzymol.* **31**, 667 (1974).
6. D. Radzwill, K. Gerwert, and H.-J. Steinhoff, *Biophys. J.* **80**, 2856 (2001).
7. H.-J. Steinhoff, A. Savitsky, C. Wegener et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1457**, 253 (2000); K. Mobius, A. Savitsky, Ch. Wegener et al., *Magn. Resonance in Chemistry*. **43**, S4 (2005); N. Radzwill, K. Gerwert and H.-J. Steinhoff, *Biophys. J.* **80**, 2856 (2001).
8. C. Beier and H.-J. Steinhoff, *Biophys. J.* **91**, 2647 (2006).
9. D. Mustafi, G. B. Wells, H. Joela et al., *Free Radic. Res. Commun.* **10**, 95 (1990).
10. D. Mustafi and H. Joela, *J. Phys. Chem.* **99**, 11370 (1995).
11. D. Mustafi and M. W. Makinen, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 6739 (1995).
12. D. Mustafi, A. Sosa-Peinado, and M. W. Makinen, *Biochemistry*, **40**, 2397 (2001).
13. S. B. Orlinskii, J. Schmidt, P. G. Baranov et al., *Phys. Rev. Lett.* **92**, 047603 (2004).
14. S. B. Orlinskii, J. Schmidt, E. J. J. Groenen et al., *Phys. Rev. Lett.* **94**, 097602 (2005).
15. S. B. Orlinskii, H. Blok, J. Schmidt et al., *Phys. Rev. B* **74**, 045204 (2006).
16. O. G. Poluektov and J. Schmidt, *Bruker Report* **143**, 34 (1996).
17. W. B. Mims, in *Electron Paramagnetic Resonance*, Ed. S. Geschwind, Plenum Press, New-York-London, 1972.