



ВОДА В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ НЕЙРОКУПРЕИНА

ГАСПАРОВ В. С., НАЛБАНДЯН Р. М.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Методом протонной релаксации показано, что в активном центре нейрокупрена содержится одна молекула воды, координированная к меди. Расстояние между атомом меди и протонами воды составляет 0,3 нм. Время жизни молекулы воды в первой координационной сфере составляет 10^{-7} с. Показано, что основной вклад в парамагнитную релаксацию вносит вращательное броуновское движение макромолекулы белка.

Нейрокупренн—крайне кислый медьсодержащий белок, полученный из мозга, имеет M_r 10 кД и содержит 1 атом меди [1]. Он способен связывать и вступать в окислительно-восстановительные реакции с катехоламинами [2], которые возможны благодаря наличию меди в белке. Медь нейрокупрена принадлежит к так называемому второму типу, который, в частности, характеризуется доступностью к растворителю (воде). В связи с этим для изучения особенностей связывания воды в активном центре нейрокупрена целесообразно использовать метод протонной магнитной релаксации. Нейрокупренн, содержащий единственный атом меди, является особенно удобным объектом для таких исследований. В данной работе приведены результаты изучения нейрокупрена этим методом.

Материалы и методы

Нейрокупренн из мозга крупного рогатого скота был получен по методу Gasparov и соавт. [2], а апонейрокупренн—по методу Sharoyan и соавт. [1]. Восстановление белка проводили дитионитом натрия, удаляя избыток восстановителя гель-фильтрацией через сефадекс G-25 (сверхтонкий). Во всех описанных экспериментах белок ($5 \cdot 10^{-4}$ М) был растворен в 0,2 М ацетатном буфере, pH 6,0. Изменения pH этого раствора достигали добавлением 0,1 н. HCl или NaOH.

Время спин-решеточной (T_1) и спин-спиновой (T_2) релаксаций измеряли на импульсном ЯМР-спектрометре фирмы «Bruker» BKR-322S. T_1 —при помощи стандартной импульсной последовательности: 180° — τ — 90° , а T_2 —методом Карра-Парселла-Мейбума-Гилла [3]. Погрешность измерения T_1 и T_2 не превышала $\pm 5\%$.

Как известно, экспериментально измеряемые величины T_1 и T_2 для водных растворов белков, содержащих парамагнитный металл, и число молекул воды, связанных с этим металлом, находятся в зависимости друг от друга согласно уравнению Луза-Мейбума [4].

$$(\rho_m T_{ip})^{-1} = \frac{q}{\tau_m + T_{im}}, \quad (i = 1, 2)$$

где $(T_{ip})^{-1}$ представляет парамагнитный вклад связанного с белком металла в скорость протонной релаксации воды, ρ_m — отношение молярной концентрации связанного парамагнитного иона к концентрации воды, T_{1m} и T_{2m} — время продольной и поперечной релаксации протонов воды в первой координационной сфере металла, q — число молекул воды, связанных с металлом, τ_m — время жизни молекул воды в первой координационной сфере.

Время релаксации T_{1m} и T_{2m} для первой координационной сферы ионов меди может быть найдено из уравнений Соломона-Бломбергена [5, 6] в упрощенной для макромолекула форме:

$$\frac{1}{T_{1m}} = \frac{2}{15} \cdot \frac{\gamma_j^2 g^2 \beta^2 S(S+1)}{r^6} \cdot \left(\frac{3\tau_c}{1 + \omega_j^2 \tau_c^2} \right)$$

$$\frac{1}{T_{2m}} = \frac{1}{15} \cdot \frac{\gamma_j^2 g^2 \beta^2 S(S+1)}{r^6} \cdot \left(4\tau_c + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_j^2 \tau_c^2} \right),$$

где γ_j — ядерное гиромагнитное отношение, β — магнетон Бора, τ — расстояние между ионом металла и протоном связанной с металлом воды, ω_j — Ларморова прецессия ядра, τ_c — время корреляции, характеризующее диполь-дипольное взаимодействие между спинами электрона и ядра, определяемое как сумма:

$$\tau_c^{-1} = \tau_R^{-1} + \tau_s^{-1} + \tau_m^{-1},$$

где τ_R — вращательное время корреляции связанного парамагнитного центра τ_s — время спин-решеточной релаксации электрона.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены значения T_1^{-1} и T_2^{-1} растворов нейрокуперина в окисленной, восстановленной и апо-форме. Резкое увеличение (в 5–6 раз) времен протонной релаксации окисленного белка по сравнению с восстановленной и апо-формой непосредственно указывает на наличие координированной к меди воды.

Таблица 1

Скорости протонной релаксации (s^{-1}), водных растворов нейрокуперина в 0,2 М ацетатном буфере, pH 6,4 при $T=300^\circ K$ на частоте 20 МГц

Препарат	$T_1^{-1} (s^{-1})$	$T_2^{-1} (s^{-1})$
Нейрокуперин окисленный	2,02	2,38
Нейрокуперин восстановленный	0,38	0,39
Апобелок	0,37	0,38
0,2 М ацетатный буфер	0,26	

На рис. 1 представлены температурные зависимости нормализованных парамагнитных вкладов раствора нейрокуперина, измеренных

на частотах 20 и 38,4 МГц. Как видно, температурные коэффициенты имеют отрицательный знак. С другой стороны, τ_m уменьшается с увеличением температуры. Поэтому можно заключить, что для данной области температур и частот выполняется условие быстрого химического обмена, то есть $\tau_m \ll T_{im}$. Следовательно, в упрощенном виде можно считать:

$$\frac{1}{T_{ip}} \approx \frac{\rho q}{T_{im}}$$

Рассчитанная величина при 300°K и 20 МГц оказалась равной $3,6 \cdot 10^{-9}$ с и близка к $\tau_R = 4,2 \cdot 10^{-9}$ с, полученной из гидродинамического уравнения Стокса-Эйнштейна. Это свидетельствует о том, что основной вклад в парамагнитную релаксацию вносит вращательное броуновское движение всей макромолекулы.

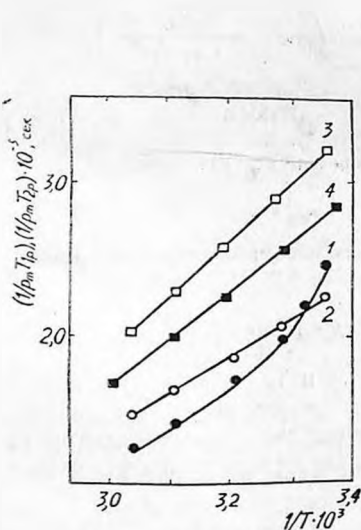


Рис. 1.

Рис. 1. Температурные зависимости нормализованных парамагнитных вкладов скоростей протонной релаксации воды нейрокупрена при рН 6,0. (—●—) — зависимость для $1/\rho_m T_{1p}$ при 20 МГц, (—○—) — зависимость для $1/\rho_m T_{1p}$ при 38,4 МГц, (—■—) — зависимость для $1/\rho_m T_{2p}$ при 20 МГц, (—□—) — зависимость для $1/\rho_m T_{2p}$ при 38,4 МГц.

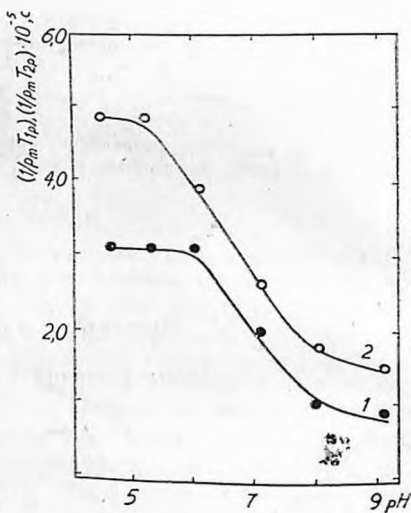


Рис. 2.

Рис. 2. Парамагнитные вклады в скорости протонной релаксации воды в водных растворах нейрокупрена в зависимости от рН при 20 МГц и 300 К. (—●—) — данные для $1/\rho_m T_{1p}$, (—○—) — данные для $1/\rho_m T_{2p}$.

рН-зависимости парамагнитных вкладов приведены на рис. 2. Как и оптические и ЭПР-спектры, изменения парамагнитных вкладов в зависимости от рН были полностью обратимы в диапазоне рН 4—10. Полученные зависимости имеют характер кривых титрования с точкой

перегиба вблизи от pH 7,0, что указывает на депротонирование воды, являющейся лигандом.

Определенный интерес представляет сравнение свойств воды, координированной к меди нейрокупреина и супероксиддисмутазы. Хорошо известно, что водный лиганд, координированный к меди в экваториальном положении, заметно отличается по свойствам от аксиально координированной воды. Так, экваториальный водный лиганд замещается сравнительно легче, чем аксиальный. Водный лиганд меди нейрокупреина имеет большее сходство с аксиальным. Как видно из табл. 2, в которой сравниваются основные параметры воды нейрокупреина и супероксиддисмутазы [7], вода в нейрокупреине находится на расстоянии 0,3 нм от атома меди и имеет время жизни $\tau_m = 10^{-7}$ с. Эти данные показывают также, что в первой координационной сфере меди в нейрокупреине содержится только одна молекула воды.

Таблица 2.

Параметры воды, координированной к меди в
нейрокупреине и супероксиддисмутазе

Величина	Нейрокупреин	Супероксиддисмутаза [7]	
		Аксиальный лиганд	Экваториальный лиганд
$\tau_m(\text{с})$	10^{-7}	$1,6 \cdot 10^{-7}$	$1,0 \cdot 10^{-5}$
$r(\text{нм})$	0,3	0,34	0,27
q	1	1	$\frac{1}{2}$
$\tau_e(\text{с})$	$4,3 \cdot 10^{-9}$ (при 20 МГц)	$2,7 \cdot 10^{-9}$ (при 60 МГц)	$2,7 \cdot 10^{-9}$ (при 60 МГц)

Наличие молекулы воды в медьсодержащем участке нейрокупреина объясняет ранее обнаруженную сильную зависимость формы сигнала ЭПР меди от pH [1] и указывает, что реакции замещения в активном центре белка идут именно через этот водный лиганд.

Мы выражаем признательность Гапгардту М. Г. (МГУ) за измерения, проведенные на частоте 36,4 МГц.

WATER IN THE ACTIVE SITE OF NEUROCUPREIN

GASPAROV V. S., NALBANDYAN R. M.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences, Armenian SSR, Yerevan

Proton relaxation method has been used to detect a water molecule coordinated to copper in the active centre of neurocuprein. The distance between copper and protons of water was evaluated to be 0,3 nm. The life-time of water in the first coordination sphere is 10^{-7} sec. Brownian motion of the protein macromolecule is the main contributor to paramagnetic relaxation.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Sharoyan S. G., Shaljian H. H., Nalbandyan R. M., Buniatian H. Ch. *Biochim. et biophys. acta* v. 493, p. 478—487, 1977.
2. Gasparov V. S., Nalbandyan R. M., Buniatian H. Ch, *FEBS Lett.* v. 97, № 2, p. 37—39, 1979.
3. Farrar T. C., Becker E. D. *Pulsed and Fourier Transform NMR*, 1971.
4. Luz Z., Meiboom S. J. *Chem. Phys.*, v. 40, p. 2686—2692, 1964.
5. Solomon J. *Physiol. Revs.*, v. 99, p. 559—565, 1955.
6. Blombergen N. J. *Chem. Phys.*, v. 27, p. 512—516, 1957.
7. Boden N., Holmes M. C., Knowles P. F. *Biochem. J.*, v. 177, p. 303—309, 1979.

Поступила 24. III 1985.