

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление: 03.03.02 «Физика»

Профиль: Физика

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
Исследование белка GB1 как фрагмента фьюжен белка
GB1+RimM методом спектроскопии ядерного магнитного
резонанса

Студент 4 курса группы 06-712

«17» июля 2021 г.



(Зиннатуллина А.Ф.)

Научный руководитель
канд. физ.-мат. наук, доцент

«17» июня 2021 г.



(Блохин Д.С.)

Научный консультант
младший научный сотрудник

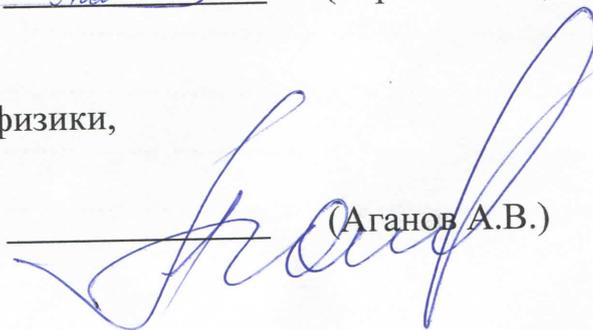
«17» июня 2021 г.



(Гараева Н.С.)

Заведующий кафедрой медицинской физики,
д-р хим. наук, профессор

«17» июня 2021 г.



(Аганов А.В.)

Казань, 2021 г.

Содержание

Введение.....	3
1. Основы ядерной магнитной спектроскопии.....	5
1.1. Явление ядерного магнитного резонанса	5
1.2. Химический сдвиг	7
1.3. Спин-спиновое взаимодействие	9
1.4. Двумерная ЯМР спектроскопия.....	10
1.4.1. Представление спектров двумерной ЯМР-спектроскопии.....	10
1.4.2. Total Correlation Spectroscopy.....	13
1.5. Трехмерный эксперимент ЯМР – спектроскопии высокого разрешения.....	14
1.5.1. Трехмерный гетероядерный ЯМР эксперимент HNCO	15
1.5.2. Трехмерный гетероядерный ЯМР эксперимент HN(CA)CO.....	16
1.5.3. Трехмерный гетероядерный ЯМР эксперимент HNCA	18
1.5.4. Трехмерный гетероядерный ЯМР эксперимент HN(CO)CA	19
1.5.5. Трехмерный гетероядерный ЯМР эксперимент CBCANH.....	20
1.5.6. Трехмерный гетероядерный ЯМР эксперимент CBCA(CO)NH.....	21
1.5.7. Трехмерный гетероядерный ЯМР эксперимент CC(CO)NH	22
1.5.8. Трехмерный гетероядерный ЯМР эксперимент HBHA(CO)NH	23
1.5.9. Трехмерный гетероядерный ЯМР эксперимент H(CCO)NH.....	24
2. G - белки	26
3. Экспериментальная часть.....	28
3.1. Исследуемый образец	28
3.2. Метод исследования.....	29
3.2.1. Выделение и очистка белка.....	29
3.2.2. Регистрация и обработка спектра	30
Результаты.....	31
Заключение	41
Литература	42

Введение

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) — это явление в физике, которое уже более 50 лет эксплуатируется в самых разнообразных формах с многочисленными приложениями в химическом анализе, медицинской диагностике, биомедицинских исследованиях, характеристике материалов, химической инженерии. Особенно в области молекулярной биологии роль ЯМР неопределима, поскольку ЯМР-спектроскопия является мощным инструментом для биологов, интересующихся структурой, например, структурой белков, динамикой и взаимодействием биологических макромолекул. Также ЯМР-релаксация дает возможность изучать подвижность молекул, различать отдельные компоненты смесей по их подвижности. Во многих отраслях физики, химии, фармакологии и других областях науки и техники ЯМР-спектроскопия является важным методом изучения и контроля различных процессов и свойств материалов.

Рибосома — самая важная немембранная органелла всех живых клеток. Она служит для биосинтеза белка из аминокислот по заданной матрице на основе генетической информации матричной РНК и представляет собой нуклеопротеид, состоящий из рибосомных белков и рибосомной РНК [1].

Важным фактором сборки рибосом является рибосомальный фактор созревания RimM (Ribosome Maturation Protein). Данный белок вовлечен в созревание 30-й рибосомной субъединицы. Он связывается с рибосомным белком S19, который располагается в головном домене субъединицы 30S. Множественная юстировка последовательностей предсказала, что RimM обладает двумя доменами в своих N - и C-концевых областях. Остатки от 1 до 80 белка RimM складываются в единый структурный домен, принимающий шестиструнную β - баррель. С другой стороны, C-концевая область RimM (остатки 81-162) частично сложена в растворе.

Предыдущие генетические подходы предполагали, что белок RimM участвует в созревании определенной области, состоящей из спиралей 31 и

33b 16S рРНК, а также r-белков S13 и S19 в головном домене субъединицы 30S. Результаты анализа снижения уровня глутатион- S- трансферазы также показали, что белок RimM связывается с r-белком S19. Кроме того, на основе «карты порядка сборки» и «карты порядка кинетики» для созревания частиц 30S, в котором r-белки классифицируются как ранние, средние, среднепоздние и поздние связующие вещества, r-белки S2, S13 и S19 включены в число поздних связующих для сборки головки субъединицы 30S. Связывание r-белка S19 со спиралью 33b 16S рРНК вызывает конформационные изменения в 3'-главном домене 16S рРНК. Следовательно, белок RimM участвует в связывании r-белка S19 с 16S рРНК и играет важную роль в созревании головного домена 30S субъединицы [2].

Не менее важную роль имеет домен В1 с 56 остатками стрептококкового белка G (GB1). Данный белок способствует стабилизации синтеза нестабильных белков. Поэтому изучение GB1 представляет большой интерес для науки.

Целью данной работы являлось установление соотношения сигналов ЯМР-спектров белка GB1 как фрагмента фьюжен белка GB1+RimM для получения таблицы химических сдвигов и определения вторичной структуры.

1. Основы ядерной магнитной спектроскопии

1.1. Явление ядерного магнитного резонанса

Основу спектроскопии ядерного магнитного резонанса составляют магнитные свойства атомного ядра. Из физики атомного ядра известно, что некоторые ядра обладают угловым моментом P , а он обуславливает появление у этого ядра магнитного момента μ . Обе эти величины связаны соотношением:

$$\mu = \gamma P, \quad (1)$$

здесь γ – гиромагнитное отношение – константа, которая характеризует данное ядро.

Исходя из основ квантовой теории угловой момент и ядерный магнитный момент квантованы. Совершенно невозможно данное свойство объяснить с помощью классической физики. Разрешенные или собственные значения максимальной проекции углового момента на ось z произвольно выбранной системы декартовых координат измеряются в единицах $\hbar (= h/2\pi)$ и определяются соотношением:

$$P = \hbar m_I, \quad (2)$$

где m_I – магнитное квантовое число, которое характеризует стационарные состояния ядра. Согласно условию квантования, оно принимает следующие значения:

$$m_I = I, I - 1, I - 2, \dots, -I, \quad (3)$$

где I – спиновое квантовое соответствующего ядра. Полное число возможных собственных значений или энергетических будет составлять $2I + 1$. Спиновое квантовое число протона равно $\frac{1}{2}$. Компонентой углового момента спинового квантового числа называют спином, в соответствии с уравнением (2) дается соотношением

$$P = \hbar I. \quad (4)$$

Выходит, что протон может находиться только в двух спиновых состояниях, которые в свою очередь описываются магнитными квантовыми числами $m_I = \frac{1}{2}$ и $m_I = -\frac{1}{2}$ [3].

Исходя из этого можно сделать вывод, что ЯМР - спектроскопия возникает из-за того, что ядра обладают свойством, известным как спин. Квантовая механика говорит нам, что ядерный спин характеризуется квантовым числом ядерного спина, I . Для всех ядер, о которых идёт речь, $I = \frac{1}{2}$, хотя возможны и другие значения. В ЯМР энергетический уровень (или состояние, как его иногда называют) с $m_I = \frac{1}{2}$ обозначается α и иногда описывается как "спин вверх". Состояние с $m_I = -\frac{1}{2}$ обозначается β и иногда описывается как "спин вниз".

1.2. Химический сдвиг

В основе спектроскопии ЯМР лежит ее способность отличить некоторое ядро, находящееся в определенном окружении в молекуле, от других ядер того же типа. Значение резонансной частоты конкретного ядра во многом зависит от молекулярной структуры вследствие того, что распределение электронов в химических связях в молекуле может оказать влияние на резонансные частоты отдельных ядер одного типа. Если для демонстрации данного явления использовать протон, то в спектре такого соединения, как бензилацетат, например, будут присутствовать три различных сигнала от протонов фенильного ядра, метиленовой и метильной групп. Такой эффект вызванный различным химическим окружением протонов в молекуле, называется химическим сдвигом.

При наложении магнитного поля V_0 в соответствии с законом Ленца возникает магнитный момент, который направлен противоположно полю. Таким образом, возникает эффект, соответствующий магнитному экранированию ядра - локальное поле на ядре оказывается меньше приложенного на величину σV_0 , где σ – константа экранирования для данного протона:

$$V_1 = V_0(1 - \sigma). \quad (5)$$

Для того чтобы указать положение резонансного сигнала в спектре ЯМР, в принципе можно измерить внешнее поле V_0 или резонансную частоту ν , при которой появляется линия резонанса. Однако эти параметры неудобны для измерения химического сдвига, так как спектрометры ЯМР работают при разных полях V_0 и с изменением поля меняется и резонансная частота. Более того, абсолютное определение величины поля или резонансной частоты технически трудно осуществить. Следовательно, положение резонансного сигнала необходимо измерять относительно сигнала эталонного соединения, т.е. стандарта. Для протонного ЯМР таким соединением служит тетраметилсилан (ТМС). Его двенадцать протонов дают узкий сигнал,

который записывается всегда одновременно со спектром исследуемого соединения.

Для химического сдвига была введена безразмерная величина, которая определяется следующим образом:

$$\delta = \frac{\nu_{\text{вещество}} - \nu_{\text{эталон}}}{\nu_0}. \quad (6)$$

Здесь ν_0 - рабочая частота используемого спектрометра, а в качестве единиц в δ - шкале используются миллионные доли (м.д.) [3].

1.3. Спин-спиновое взаимодействие

Сигналы протона в спектре ЯМР могут быть изображены в виде синглета - одиночной линии или в виде нескольких линий. В случае, когда сигнал изображается в виде двух линий – сигнал будет называться «дублет»; в виде трех линий – «триплет», в виде четырех линий – «квадруплет», или «квартет». Кроме того, сигнал может изображаться в виде шести и более линий, тогда речь идет о мультиплете [3].

Спин-спиновое взаимодействие – это взаимодействие спинов протонов, которое возникает за счет магнитного взаимодействия между протонами, передающимися через электронные связи. Поэтому благодаря спин-спиновым взаимодействиям производится расщепление сигнала протона на компоненты.

В соответствии с принципом Паули: электроны, которые связывают пару ядер, спарены. Соответственно, спины электронов являются антипараллельными. Каждое ядро в своем магнитном поле имеет склонность спаривать свой спин со спином одного из связывающих электронов таким образом, чтобы большинство из них оказывались антипараллельны (соответствует устойчивому состоянию).

Обычно спин-спиновое взаимодействие распространяется очень слабо не далее трех связей, если только это не напряженные циклы, мостиковые системы, делокализованные системы (в ароматических или ненасыщенных структурах) [4].

1.4. Двумерная ЯМР спектроскопия

1.4.1. Представление спектров двумерной ЯМР-спектроскопии

На спектрах экспериментов двумерной спектроскопии ЯМР наблюдаются сигналы двух типов: диагональные пики и кросс-пики.

Диагональные пики соответствуют пикам в экспериментах одномерной ЯМР, в то время как кросс-пики показывают связывание между парой атомных ядер.

Условием возникновения кросс-пиков является существование корреляции между сигналами спектра для каждой из двух осей в данных значениях. Следовательно, посмотрев на кросс-пики между разными сигналами, можно определить какие атомы соединены друг с другом. Чтобы узнать, какую связь представляет кросс-пик, нужно просто найти диагональный пик над или под кросс-пиком, и другой диагональный пик слева или справа от кросс-пика.

В двумерной спектроскопии интенсивность строится как функция двух частот, обычно называемых F_1 и F_2 , в то время, как обычные спектры ЯМР (одномерные спектры) представляют собой графики зависимости интенсивности от частоты. Существуют различные способы представления двумерного спектра на бумаге, но наиболее распространенным является создание контурного графика, в котором интенсивность пиков представлена контурными линиями, проведенными через соответствующие промежутки времени. Положение каждого пика задается двумя частотными координатами, соответствующими F_1 и F_2 . Двумерные спектры ЯМР всегда расположены так, что координаты F_2 пиков соответствуют координатам, найденным в нормальном одномерном спектре, и это соотношение часто подчеркивается построением одномерного спектра вдоль оси F_2 .

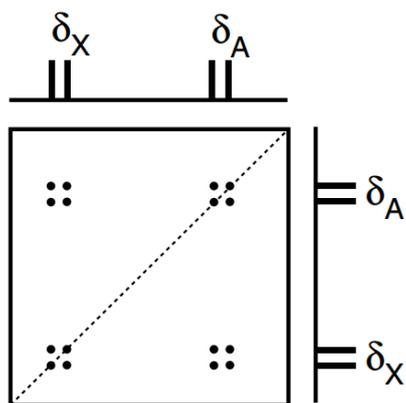


Рисунок 1 – Двумерный спектр ЯМР молекулы

На рисунке 1 изображен схематичный спектр излучения гипотетической молекулы, которая содержит всего два протона, А и Х, связанные между собой. Одномерный спектр строится вдоль оси F_2 и состоит из привычной пары дублетов, центрированных на химических сдвигах А и Х, δ_A и δ_X соответственно. В спектре координаты F_1 пиков в двумерном спектре также соответствуют координатам, найденным в нормальном одномерном спектре, и чтобы подчеркнуть эту точку, одномерный спектр был нанесен вдоль оси F_1 . Сразу видно, что этот спектр имеет некоторую симметрию относительно диагонали $F_1 = F_2$, которая была обозначена пунктирной линией.

В одномерном спектре скалярные связи порождают мультиплеты в спектре. В двумерных спектрах идея мультиплета должна быть несколько расширена, чтобы в таких спектрах мультиплет состоял из массива отдельных пиков, часто создающих впечатление квадратного или прямоугольного контура.

Несколько таких массивов пиков можно увидеть в схематическом спектре, показанном выше. Эти двумерные мультиплеты бывают двух различных типов: диагонально-пиковые мультиплеты, которые центрируются вокруг одних и тех же частотных координат F_1 и F_2 , и кросс-пиковые мультиплеты, которые центрируются вокруг различных координат

F_1 и F_2 . Таким образом, в схематическом спектре есть два диагонально-пиковых мультиплета, центрированных на $F_1 = F_2 = \delta_A$ и $F_1 = F_2 = \delta_X$, один кросс-пиковый мультиплет, центрированный на $F_1 = \delta_A, F_2 = \delta_X$ и второй кросс-пиковый мультиплет, центрированный на $F_1 = \delta_X, F_2 = \delta_A$. [5].

1.4.2. Total Correlation Spectroscopy

Total Correlation Spectroscopy (TOCSY) – полная корреляционная спектроскопия, позволяющая регистрировать спин-спиновое взаимодействие между ядрами одного типа. С помощью данного эксперимента можно наблюдать кросс-пики между спинами, связанных между собой неразрывной цепочкой взаимодействий. Допустим, что спин L связан со спином M, а спин M связан со спином N. В спектре TOCSY можно будет наблюдать кросс-пики не только между спинами L и M, но также между спинами L и N, если даже между ними отсутствует прямое взаимодействие. Удобство данного эксперимента заключается в следующем: при анализе спектра пептида возможно наблюдение кросс-пигов внутри одной аминокислоты, что облегчает задачу соотнесения других спектров ЯМР.

Импульсная последовательность эксперимента TOCSY (рисунок 2) представляет собой период подготовки, после которого следует действие 90° -ого импульса, возбуждающий первый спин; время t_1 – период эволюции, в течение которого кодируются сдвиги спина; действие 180° импульса, предотвращающий процесс эволюции; период смешивания и время t_2 , за которое происходит детектирование намагниченности спинов [6-9].

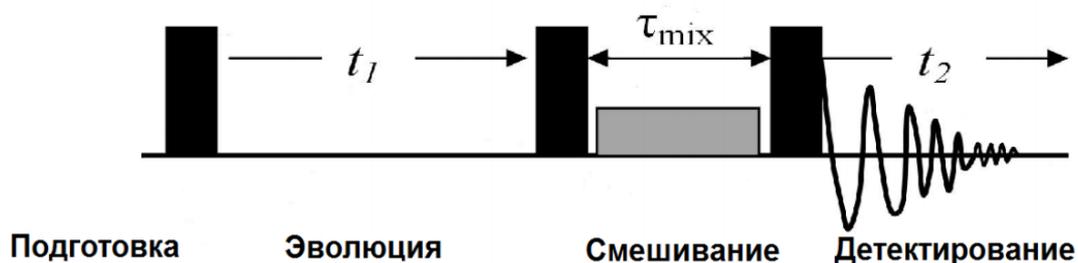


Рисунок 2 – Импульсная последовательность эксперимента TOCSY

1.5. Трехмерный эксперимент ЯМР – спектроскопии высокого разрешения

Переход к трехмерному эксперименту (3D) ЯМР - спектроскопии достигается с помощью введения дополнительного периода эволюции и смешивания. Это означает, что вводится третья временная ось. Таким образом, трехмерный эксперимент можно рассматривать как два последовательных 2D-эксперимента. 3D-спектры ЯМР можно визуализировать в виде контурных пиков в кубе, определяемом тремя осями ω_1 , ω_2 и ω_3 , полученными тремя шагами преобразования Фурье из трех временных осей t_1 , t_2 и t_3 (время получения). Одним из примеров может быть спектр ^1H NOESY–TOCSY, где t_1 - время эволюции NOESY, а t_2 - время смешивания TOCSY. В этом случае плоскость ω_1 - ω_2 эквивалентна 2D-спектру TOCSY, плоскость ω_2 – ω_3 является 2D – спектром NOESY, а плоскость ω_1 - ω_3 , иногда называемая плоскостью обратного переноса, содержит пики от спинов, которые коррелируются как через Nое, так и через J-связь. 3D-дисплей рассматривается как стопка 2D-плоскостей, параллельных одной из осей, обычно ω_3 , так как это обычно имеет самое высокое цифровое разрешение. Существует множество примеров таких комбинаций 2D-экспериментов, таких как HSQC – TOCSY и 3D-корреляция $^1\text{H}^{13}\text{C}^{31}\text{P}$ [5].

1.5.1. Трехмерный гетероядерный ЯМР эксперимент HNCO

Эксперимент HNCO является чувствительным экспериментом с тройным резонансом. Он показывает связь амидной группы с карбонильным углеродом.

Намагничивание передается от ^1H до ^{15}N , а затем избирательно к карбонилу ^{13}C через J-связь $^{15}\text{NH}-^{13}\text{CO}$ (рисунок 3). Затем намагничивание передается обратно через ^{15}N в ^1H для обнаружения. Химический сдвиг развивается на всех трех ядрах, что приводит к трехмерному спектру [10].

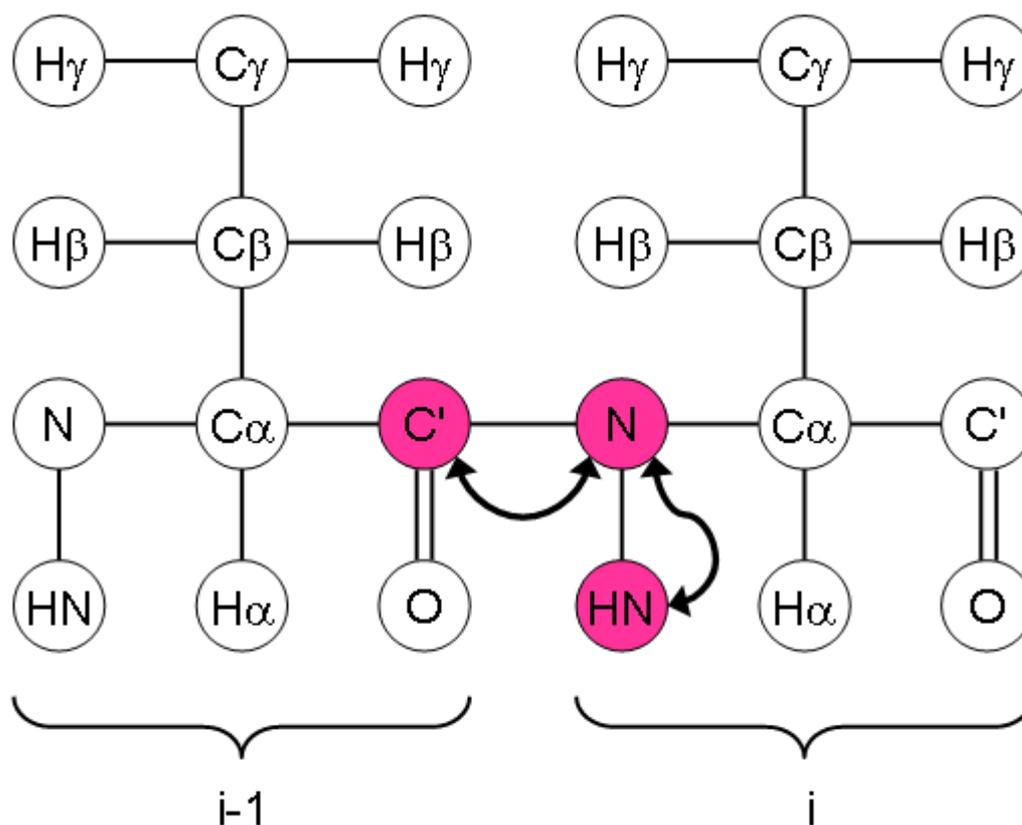


Рисунок 3 - Передача намагниченности в эксперименте HNCO

1.5.2. Трехмерный гетероядерный ЯМР эксперимент HN(CA)CO

В данном эксперименте намагничивание передается от ^1H до ^{15}N , а затем через $\text{N}-\text{C}_\alpha$ J-связь к $^{13}\text{C}_\alpha$. Оттуда он передается на ^{13}CO через J-образную муфту $^{13}\text{C}_\alpha-^{13}\text{CO}$ (рисунок 4).

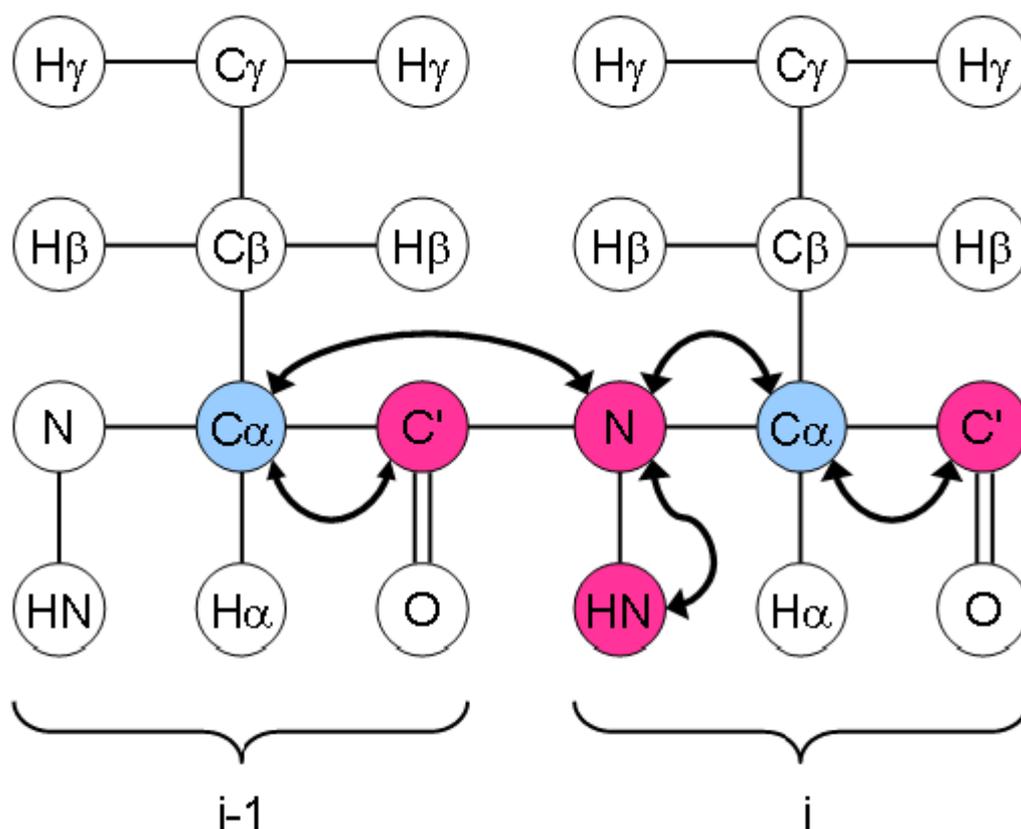


Рисунок 4 - Передача намагниченности в эксперименте HN(CA)CO

Для обнаружения намагниченность передается обратно таким же образом: от ^{13}CO к $^{13}\text{C}_\alpha$, ^{15}N и, наконец, ^1H . Химический сдвиг развивается только на ^1H , ^{15}N и ^{13}CO . В результате получается трехмерный спектр. Поскольку амидный азот связан с C_α углеродом собственного остатка, а также с C_α предыдущего остатка, происходят оба этих переноса и происходит перенос к обоим ядрам ^{13}CO . Таким образом, для каждой NH -группы в спектре наблюдаются две карбонильные группы. Но поскольку связь между

N_i и $S\alpha_i$ сильнее, чем между N_i и $S\alpha_{i-1}$, пик $H_iN_iCO_i$ обычно оказывается более интенсивным, чем пик $H_iN_iCO_{i-1}$ [10].

1.5.3. Трехмерный гетероядерный ЯМР эксперимент HNCA

В этом эксперименте намагничивание передается от ^1H к ^{15}N , а затем через N-C α J-соединение к $^{13}\text{C}\alpha$, а затем снова возвращается к ^{15}N и ^1H (рисунок 5). Данный эксперимент позволяет связать сигналы амидных групп со связанными с ними химическими связями углеродами C α i-го и i-1-го аминокислотного остатка [10].

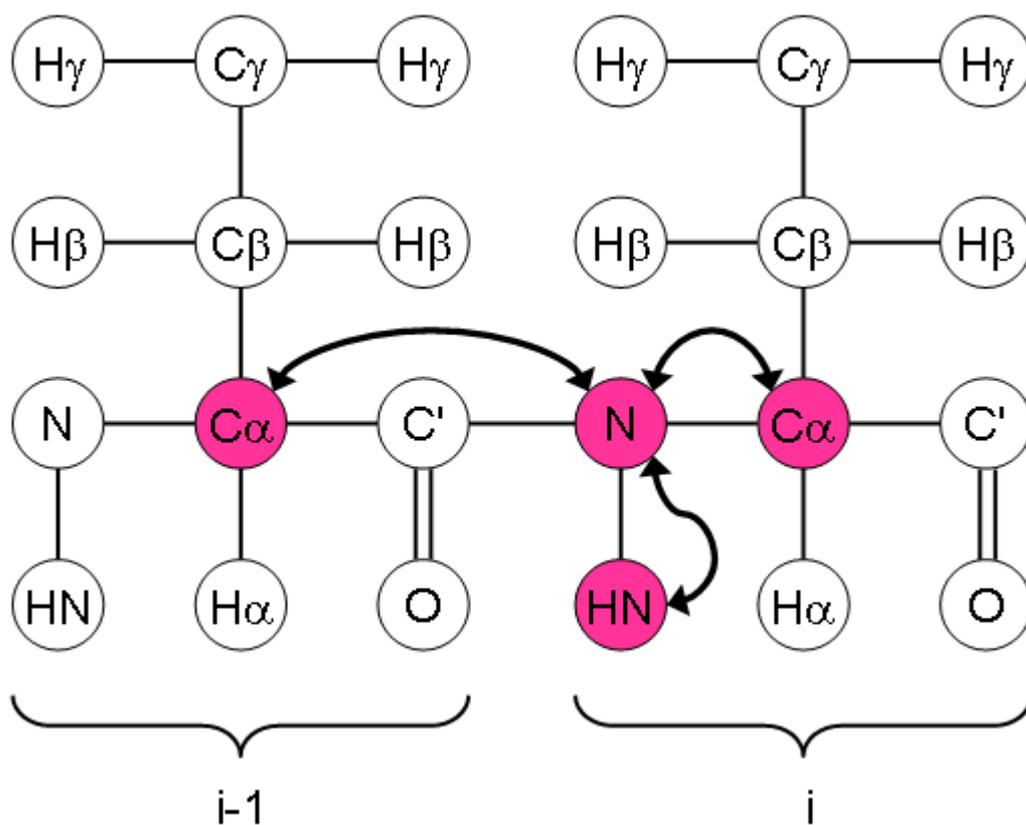


Рисунок 5 - Передача намагниченности в эксперименте HNCA

1.5.4. Трехмерный гетероядерный ЯМР эксперимент HN(CO)CA

Намагничивание проходит от ^1H до ^{15}N , а затем до $^{13}\text{C}_\alpha$ (рисунок 6). Отсюда он переносится в $^{13}\text{C}_\alpha$, и происходит химический сдвиг. Затем намагничивание передается обратно через ^{13}CO до ^{15}N и ^1H для обнаружения. Химический сдвиг проявляется только для ^1HN , ^{15}NH и $^{13}\text{C}_\alpha$, но не для ^{13}CO . Это приводит к спектру, который схож со спектром HNCA, но который является селективным для C_α предыдущего остатка [10].

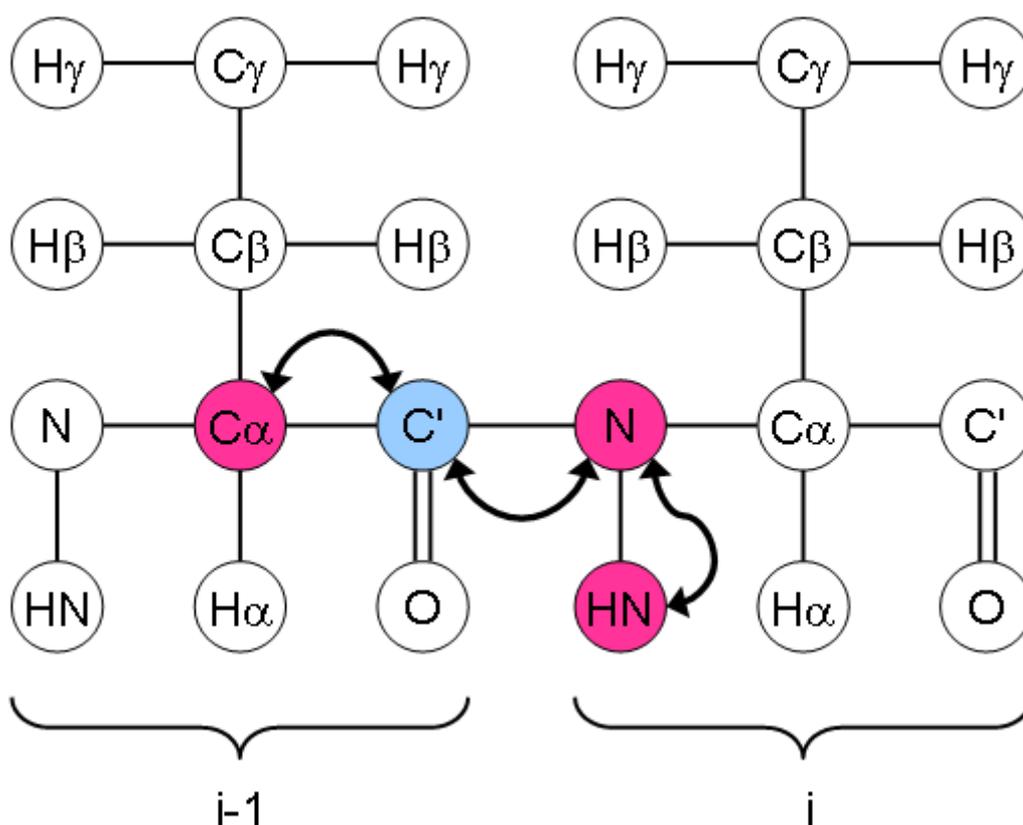


Рисунок 6 - Передача намагниченности в эксперименте HN(CO)CA

1.5.5. Трехмерный гетероядерный ЯМР эксперимент СВСАНН

Намагниченность переносится с $^1\text{H}^\alpha$ и $^1\text{H}^\beta$ на $^{13}\text{C}^\alpha$ и $^{13}\text{C}^\beta$ соответственно, а затем с $^{13}\text{C}^\beta$ на $^{13}\text{C}^\alpha$ (рисунок 7). Отсюда он переносится сначала на $^{15}\text{N}^H$, а затем на $^1\text{H}^N$ для обнаружения. Перенос формы $\text{C}_{\alpha-1}$ может происходить как до $^{15}\text{N}_{i-1}$, так и до $^{15}\text{N}_i$, или, если смотреть иначе, намагничивание передается на $^{15}\text{N}_i$ как от $^{13}\text{C}_{\alpha_i}$, так и от $^{13}\text{C}_{\alpha_{i-1}}$. Таким образом, для каждой NH-группы видны два пика C_α и C_β . Химический сдвиг развивается одновременно на $^{13}\text{C}_\alpha$ и $^{13}\text{C}_\beta$, так что они появляются в одном измерении. Химические сдвиги, происходящие в двух других измерениях, составляют $^{15}\text{N}^H$ и $^1\text{H}^N$ [10].

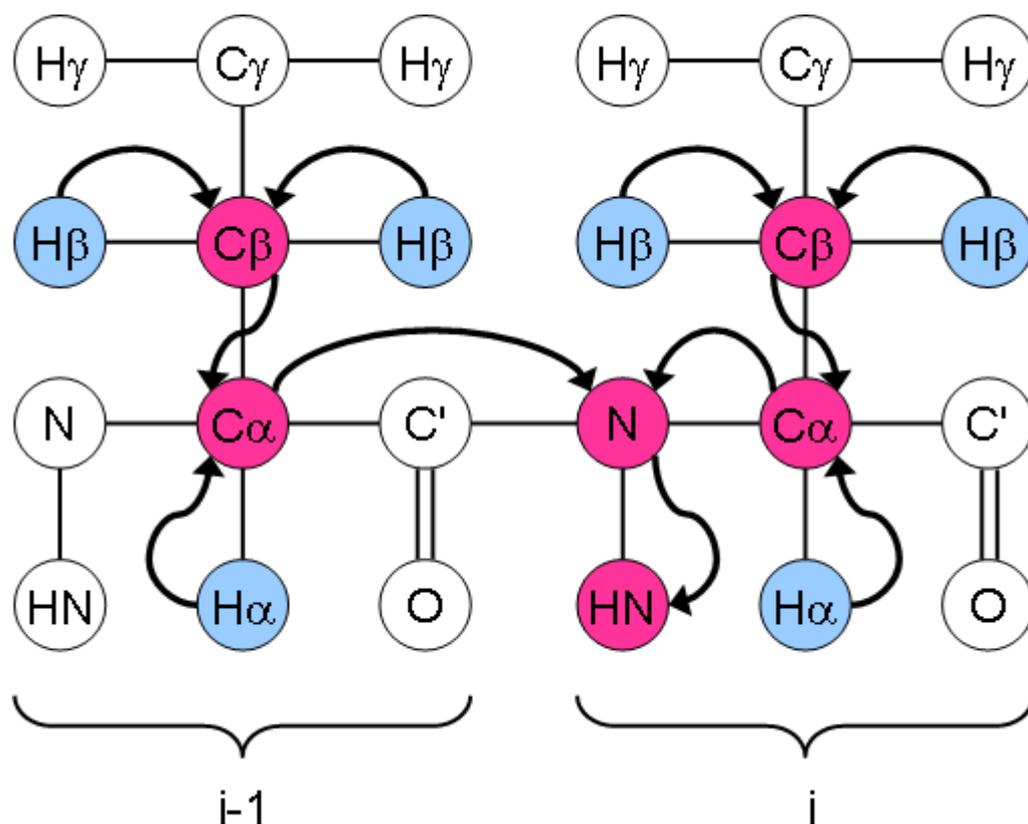


Рисунок 7 - Передача намагничивания СВСАНН

1.5.6. Трехмерный гетероядерный ЯМР эксперимент СВСА(CO)NH

Намагниченность переносится с $^1\text{H}_\alpha$ и $^1\text{H}_\beta$ на $^{13}\text{C}_\alpha$ и $^{13}\text{C}_\beta$ соответственно, а затем с $^{13}\text{C}_\beta$ на $^{13}\text{C}_\alpha$ (рисунок 8). Отсюда он переносится сначала на ^{13}CO , затем на $^{15}\text{N}^H$, а затем на $^1\text{H}^N$ для обнаружения. Химический сдвиг развивается одновременно на $^{13}\text{C}_\alpha$ и $^{13}\text{C}_\beta$, так что они появляются в одном измерении. Химические сдвиги, происходящие в двух других измерениях, составляют $^{15}\text{N}^H$ и $^1\text{H}^N$. Химический сдвиг не развился на ^{13}CO [10].

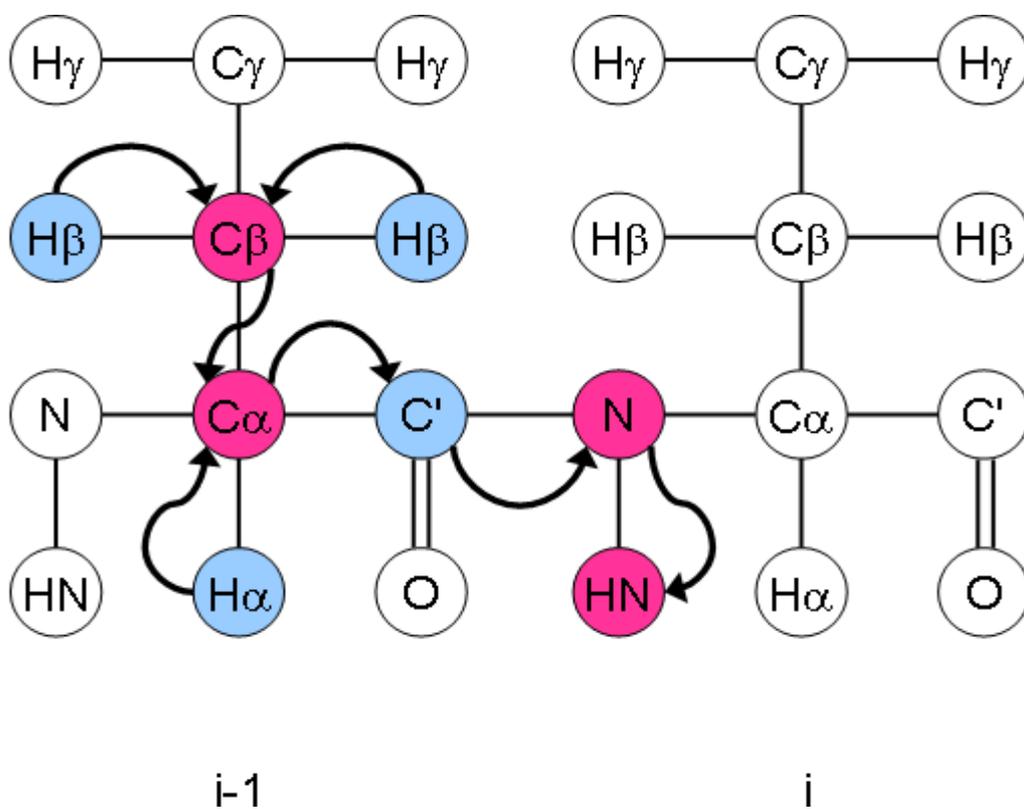


Рисунок 8 - Передача намагничивания СВСА(CO)NH

1.5.7. Трехмерный гетероядерный ЯМР эксперимент $CC(CO)NH$

Намагничивание передается от боковых цепочек ядер водорода к присоединенным к ним ядрам ^{13}C (рисунок 9). Затем изотропное перемешивание ^{13}C используется для передачи намагничивания между ядрами углерода. Отсюда намагничивание переносится на карбонильный углерод, затем на амидный азот и, наконец, на амидный водород для обнаружения. Химический сдвиг развивается одновременно на всех боковых цепочках углеродных ядер, а также на амидных азотных и водородных ядрах, что приводит к трехмерному спектру.

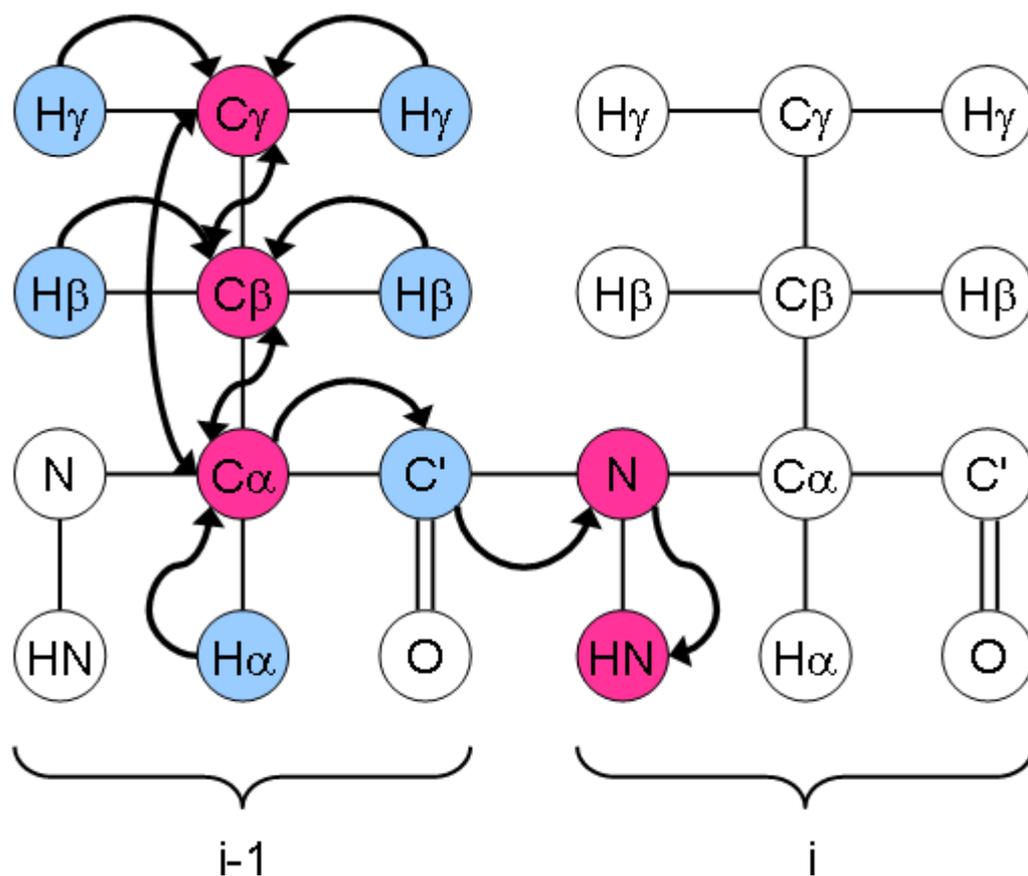


Рисунок 9 - Передача намагничивания $CC(CO)NH$

Полезность данного спектра заключается в получении назначений боковой цепи углерода [10].

1.5.8. Трехмерный гетероядерный ЯМР эксперимент НВНА(CO)NH

Этот эксперимент аналогичен СВСАС(CO)NH: намагниченность переносится с $^1\text{H}_\alpha$ и $^1\text{H}_\beta$ на $^{13}\text{C}_\alpha$ и $^{13}\text{C}_\beta$ соответственно, а затем с $^{13}\text{C}_\beta$ на $^{13}\text{C}_\alpha$ (рисунок 10). Отсюда он переносится сначала на ^{13}CO , затем на $^{15}\text{N}_\text{H}$ и затем на $^1\text{H}_\text{N}$ для обнаружения. Химический сдвиг не развился ни на одном из атомов углерода. Вместо этого он эволюционирует на $^1\text{H}_\alpha$ и $^1\text{H}_\beta$, на $^{15}\text{N}_\text{H}$ и $^1\text{H}_\text{N}$. В результате получается трехмерный спектр с одним азотным и двумя водородными измерениями.

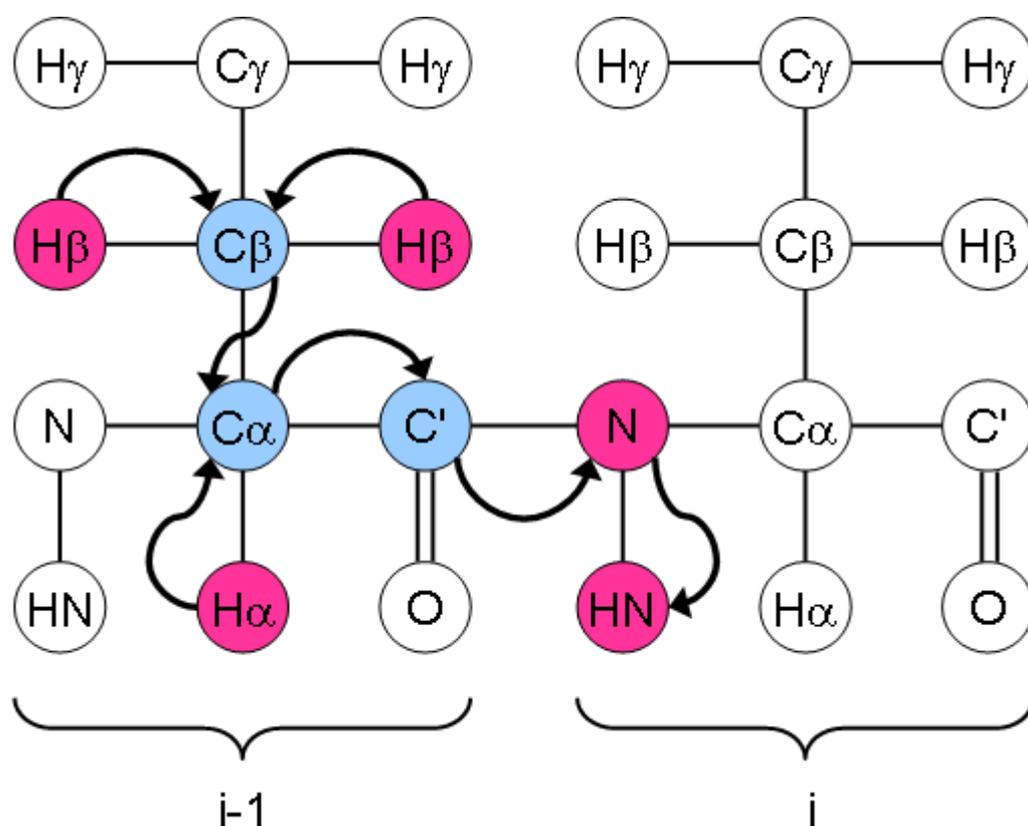


Рисунок 10 - Передача намагничивания НВНА(CO)NH

Полезность этого спектра заключается в получении назначений H_α и H_β [10].

1.5.9. Трехмерный гетероядерный ЯМР эксперимент H(CCO)NH

Намагниченность передается от ядер водорода боковой цепи к их присоединенным ядрам ^{13}C (рисунок 11). Затем изотропное смешивание ^{13}C используется для передачи намагниченности между ядрами углерода. Отсюда намагниченность передается на карбонильный углерод, далее на амидный азот и, наконец, на амидный водород для обнаружения. Химический сдвиг развивается одновременно на всех ядрах водорода боковой цепи, а также на ядрах амидного азота и водорода, в результате чего получается трехмерный спектр с одним азотным и двумя водородными измерениями [10].

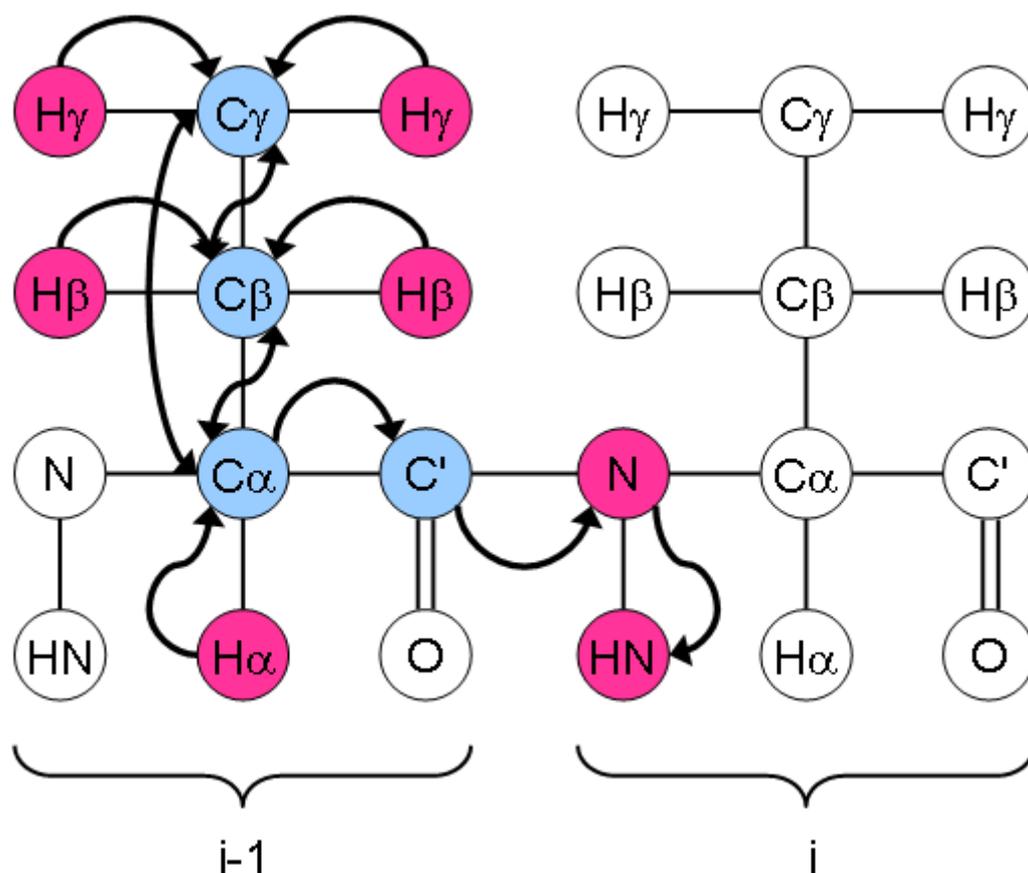


Рисунок 11 - Передача намагничивания H(CCO)NH

2. G - белки

Белок G - это белок, связывающий гуанин-нуклеотид, экспрессируемый стрептококковыми бактериями групп C и G, очень похожий на белок A, но с различной специфичностью связывания. Он экспрессируется на клеточной поверхности некоторых штаммов стрептококков группы C и G. Белок демонстрирует уникальное и специфическое сродство к Fc-области поликлонального и моноклонального иммуноглобулина G (IgG) млекопитающих. Был клонирован ген стрептококка, кодирующий белок G, в *E. Coli*, с использованием фага λ в качестве вектора. Белок G, инфицированный этим фагом *E. Coli*, был обнаружен и проанализирован с помощью аналитического метода «Вестерн – Блот» с использованием радиоактивно меченных фрагментов IgG Fc в качестве зонда. Были получены три основных полосы связывания Fc IgG, соответствующие молекулярному весу 47 000 Да, 57 000 Да и 65 000 Да, соответственно. Анализ экспрессии в *E. Coli* показывает, что эта гетерогенность вызвана посттрансляционной деградацией молекулы до того, как произошел лизис λ - инфицированных клеток *E. Coli*. Протеин G, продуцируемый в *E. Coli*, очищали аффинной хроматографией на IgG-сефарозе с последующей гель-фильтрацией на сефадексе G-200. Этот высокоочищенный белок G, продуцируемый *E. Coli*, сравнивали с белком G, солюбилизированным папаином из стрептококков, в экспериментах по прямому связыванию и в анализе конкурентного связывания. Было обнаружено, что два варианта белка G одинаково взаимодействуют с поликлональными IgG разных видов. Штаммы стрептококков, экспрессирующие белок G, также проявляют сродство к человеческому альбумину, и было обнаружено, что на молекулярном уровне белок G также отвечает за связывание альбумина. Таким образом, как *E. Coli* продуцировал протеин G, так и протеолитический фрагмент протеина G, полученный из стрептококков, связанного с альбумином. Было обнаружено, что в молекуле

протеина G два разных и отдельных сайта связывают IgG и альбумин. В результате, когда цельные стрептококки инкубировали с человеческой плазмой, взаимодействия с белком G вызывали покрытие бактерий альбумином и IgG, тогда как другие белки плазмы не проявляли сродства к белку G [11].

G-белки - это сигнальные белки, которые являются универсальными посредниками при передаче гормональных сигналов от рецепторов клеточной мембраны к эффекторным белкам, вызывающим конечный клеточный ответ. Они являются прецизионными регуляторами, включающие или выключающие активность других молекул. В связи с их участием во многих важных физиологических процессах они являются объектом интенсивного изучения [12].

3. Экспериментальная часть

3.1. Исследуемый образец

Исследуемым образцом данной работы являлся 56-аминокислотный G-связывающий домен 1 иммуноглобулина стрептококковый белок G. GB1 повышает уровень экспрессии и растворимость белков. Данный домен благодаря своей компактной складке и доступности для растворителя, не влияет ни на структуру, ни на рефолдинг целевого белка, а скорее увеличивает растворимость гибридного белка. Кроме того, стабильность GB1 позволяет отбирать образцы в широком диапазоне условий рефолдинга, что делает его надежным партнером в протоколах экспрессии фьюжен (связанных) белков. Не менее важно, что GB1 лишен остатков цистеина, тем самым облегчая среду рефолдинга цистеинсодержащих белков [13]. Производство биоактивных белков в *E. Coli* с помощью системы экспрессии слияния GB1 является эффективной недорогой стратегией и, следовательно, имеет большую ценность [14].

3.2. Метод исследования

3.2.1. Выделение и очистка белка

Экспрессия белка RimM была проведена в клеточной системе *Escherichia coli* в экспрессионном штамме BL21(plysS). Индуцировали экспрессию белка добавлением 0,5мМ изопропил-β-D-1 - тиогалактопиранозид (IPTG) и инкубировали при 37° С и перемешивании 180 об/мин в течение 4 часов. Далее для осаждения клеток проводилось центрифугирование при 4° С на центрифуге BECKMAN Avanti J-25, полученные клетки ресуспендировались в лизис буфере CRB. Лизис клеток был произведен с помощью ультразвука на установке BANDALIN при добавлении ингибиторов PIC и PMSF. Клеточный дебрис отделяли при помощи центрифугирования на BECKMAN Avanti J-25, а для осаждения крупных клеточных комплексов на ультрацентрифуге BECKMAN COULTER.

Полученный после центрифугирования супернатант был пропущен через Ni-NTA колонку (Qiagen). После промывали соответствующими отмывочными буферами А и В. Из полученных фракций были отобраны аликвоты для дальнейшей очистки. Следующий этап очистки проводится с помощью гель-фильтрации на колонке Superdex 75 10/300 при 4° С. Аликвоты из полученных фракций были отобраны и в дальнейшем проанализированы в денатурирующем ПААГ.

Полученные образцы для кристаллизации концентрировали до 0,69 мМ/мл. Концентрация белков была определена при помощи NanoDrop – 1000 (Thermo Fisher Scientific, США) по поглощению на 280 нм.

Синтез был проведен в лаборатории «Структурная биология» ИФМиБ КФУ.

3.2.2. Регистрация и обработка спектра

Регистрация спектров ЯМР проводилась на спектрометре Avance III HD TM фирмы Bruker с частотой 700МГц по протонам, оснащенным криодатчиком QCI (^1H / ^{19}F , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P). Образец для ЯМР исследований содержал 0,24 Мм GB1-RimM в растворе трисового буфера pH 7,4 меченный по изотопам ^{15}N и ^{13}C .

Для исследуемого образца при температуре 25°C была проведена регистрация трехмерных ^1H - ^{13}C - ^{15}N ЯМР-экспериментов: CBCANH, CBCA(CO)NH, CC(CO)NH, HbHA(CO)NH, HNCA, HNCO, HN(CA)CO, HN(CO)CA, H(CCO)NH. Обработка спектров проводилась с помощью программного обеспечения CcpNmr Analysis (<https://www.ccpn.ac.uk/v2-software/software/analysis>).

Результаты

Для исследуемого образца GB1 были проведены трехмерные эксперименты: CBCANH, CBCA(CO)NH, CC(CO)NH, HbHA(CO)NH, HNCA, HNCO, HN(CA)CO, HN(CO)CA, H(CCO)NH. Положение связанных с амидным протоном резонансов производилось путем поиска сигналов в срезах трехмерного спектра на соответствующих значениях химических сдвигов ядер ^1H и ^{15}N в двумерном спектре HSQC.

Последовательное отнесение сигналов позволяет определить значение величин химических сдвигов в спектрах белка. Обычно для последовательного назначения используются пары экспериментов. Спектры обычно анализируются как полосы пиков, и полосы из пары экспериментов могут быть представлены вместе рядом или как наложение двух спектров. Каждая полоса пиков может быть связана со следующей полосой пиков из прилегающего остатка, что позволяет последовательно соединять полоски. Тип остатка можно определить по химическому сдвигу пиков. Затем можно определить резонансы путем сравнения последовательности пиков с аминокислотной последовательностью белка.

Для примера рассмотрим проведение отнесения сигналов в паре экспериментов HNCA и HN(CO)CA (рисунок 12). Эксперимент HNCA, как говорилось ранее, позволяет увидеть корреляцию химического сдвига амида остатка с C_α сигнала своей аминокислоты и сигнала предыдущей аминокислоты. В результате в спектре мы наблюдаем два пика. Для идентификации пика от предыдущего C_α может быть использован эксперимент HN(CO)CA. Этот эксперимент отображает резонансы корреляции амида остатка с C_α предыдущего остатка.

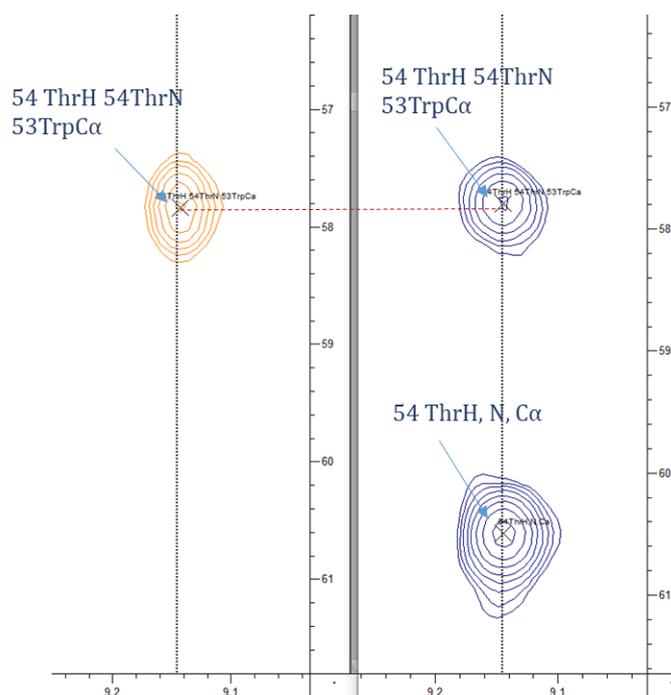


Рисунок 12 - Фрагменты 3М ЯМР-спектров (^1H 700 МГц) ^1H - ^{13}C - ^{15}N HN(CO)CA (слева) и ^1H - ^{13}C - ^{15}N HNCA (справа) белка GB1, обогащенного по изотопам ^{13}C , ^{15}N , в растворе трисового буфера pH 7,4 при $T = 25^\circ\text{C}$

В качестве второго примера рассмотрим процесс соотнесения сигналов в паре экспериментов HNCO и HN(CA)CO (рисунок 13). Эксперимент HNCO устанавливает связь между амидом остатка и карбонильным углеродом предыдущего остатка. Он является одним из чувствительных экспериментов с тройным резонансом. Этот эксперимент используют в паре с HN(CA)CO. В эксперименте HN(CA)CO регистрируются резонансы коррелирующих амид остатка с атомом карбонильного углерода своего аминокислотного остатка, а также с атомом предыдущего аминокислотного остатка.

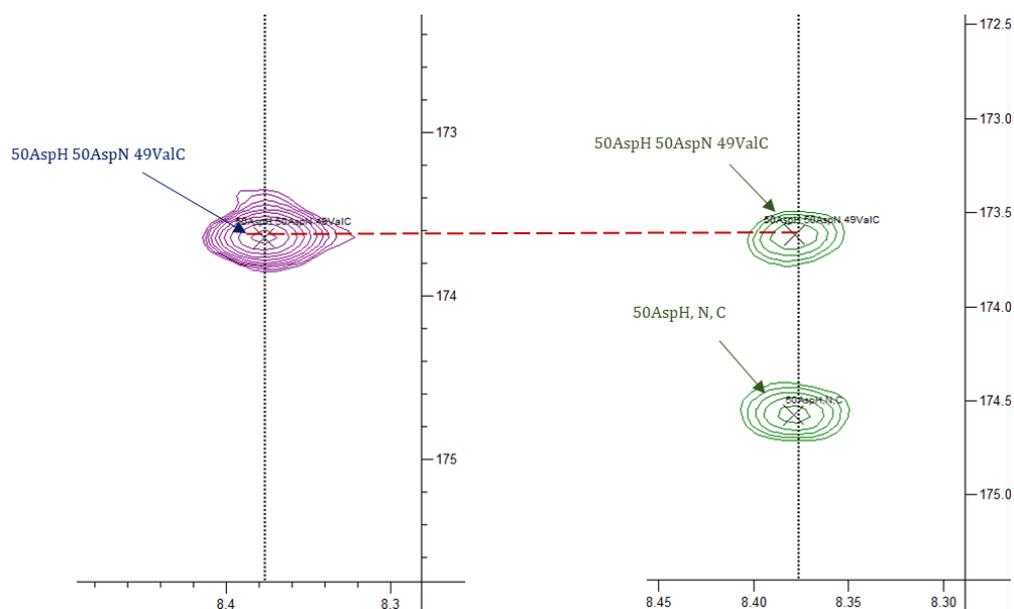


Рисунок 13 – Фрагменты 3М ЯМР-спектров (^1H 700 МГц) ^1H - ^{13}C - ^{15}N HN(CA)CO (справа) и ^1H - ^{13}C - ^{15}N HNCO (слева) белка GB1, обогащенного по изотопам ^{13}C , ^{15}N , в растворе трисового буфера pH 7,4 при $T = 25^\circ\text{C}$

В качестве третьего примера соотнесения сигналов возьмем пару экспериментов СВСА(CO)NH и СВCANH. В СВСА(CO)NH или HN(CO)CACB, регистрируются резонансы коррелирующих амид с сигналом C_α и C_β предыдущего остатка. В результате, наблюдаем два пика, один из которых принадлежит C_α (Рисунок 14), другой - C_β (Рисунок 15). Этот эксперимент обычно используют в паре с СВCANH. СВCANH регистрирует корреляцию между амидом остатка и C_α и C_β своего и предыдущего остатка. В результате, в спектре наблюдается 4 пика: 2 от своего аминокислотного остатка и 2 от предыдущего. Пики от предыдущего остатка обычно слабее и могут быть идентифицированы с помощью спектра СВСА(CO)NH.

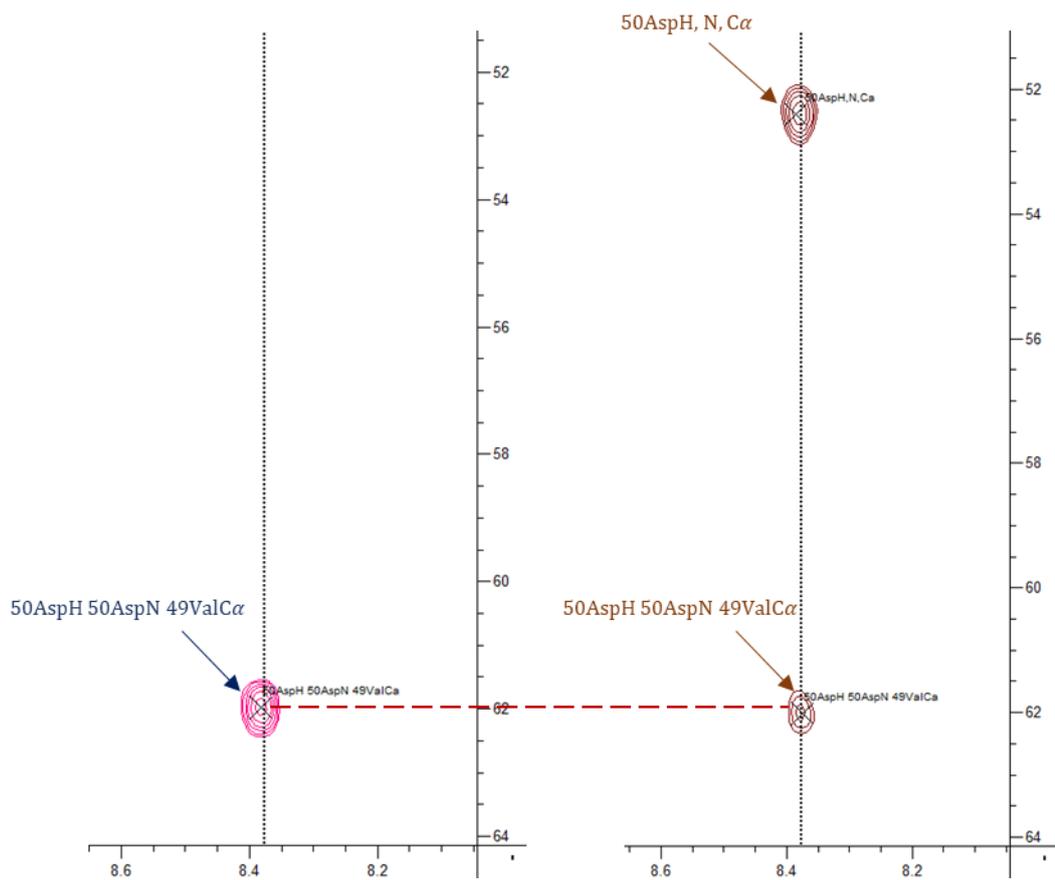


Рисунок 14 – Фрагменты 3М ЯМР-спектров (^1H 700 МГц) в области C_α ^1H - ^{13}C - ^{15}N CBACA(CO)NH (слева) и ^1H - ^{13}C - ^{15}N HNCACB (справа) белка GB1, обогащенного по изотопам ^{13}C , ^{15}N , в растворе трисового буфера pH 7,4 при $T = 25^\circ\text{C}$

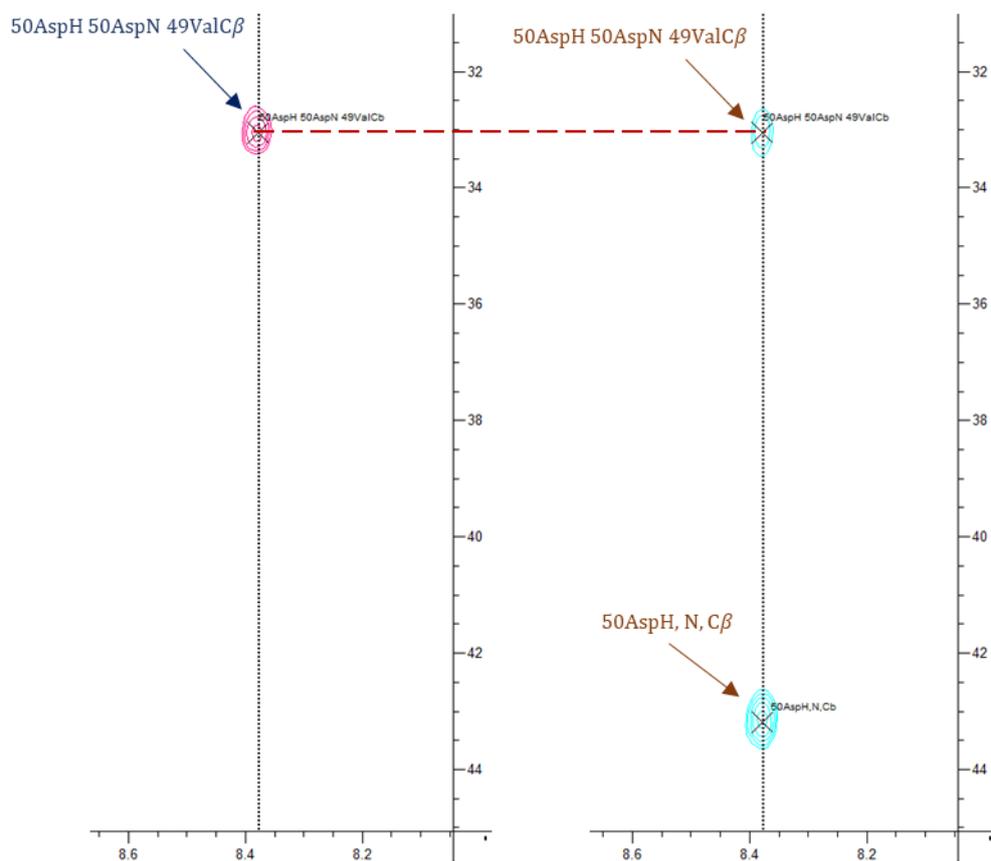


Рисунок 15 – – Фрагменты 3М ЯМР-спектров (^1H 700 МГц) в области C_β ^1H - ^{13}C - ^{15}N CBCA(CO)NH (слева) и ^1H - ^{13}C - ^{15}N HNCACB (справа) белка GB1, обогащенного по изотопам ^{13}C , ^{15}N , в растворе трисового буфера pH 7,4 при $T = 25^\circ\text{C}$

Эксперименты, описанные ранее, позволили определить химические сдвиги ядер C_α и C_β сигналов своих остатков и предыдущих остатков. Для дальнейшего нахождения значений химических сдвигов ядер был использован эксперимент HNA(CO)NH. Он позволяет увидеть сигналы атомов H_α и H_β предыдущего остатка (Рисунок 16).

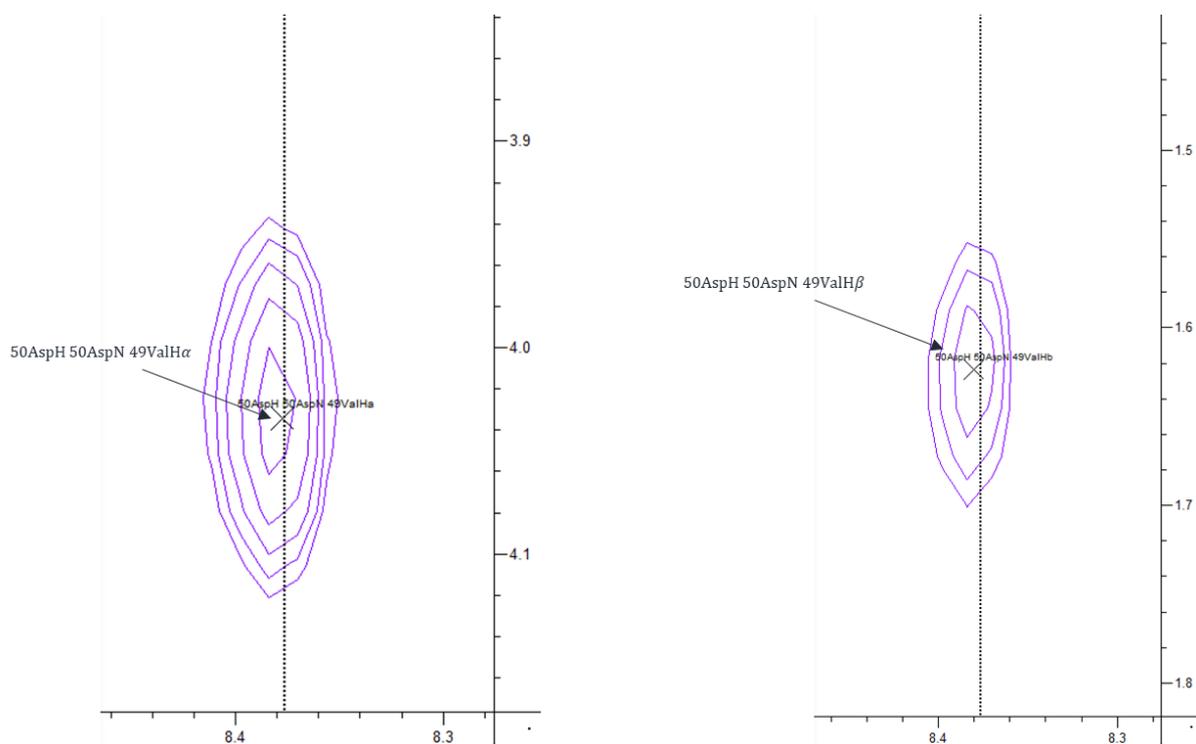


Рисунок 16 – Фрагменты 3М ЯМР-спектра (^1H 700 МГц) ^1H - ^1H - ^{15}N НВНА(CO)NH в области H_α - H_β белка GB1, обогащенного по изотопам ^{13}C , ^{15}N , в растворе трисового буфера pH 7,4 при $T = 25^\circ\text{C}$

В результате использования трехмерных ЯМР – экспериментов и всех соотношений сигналов удалось получить значения химических сдвигов для ядер ^1H , ^{13}C , ^{15}N белка GB1 (Таблица 1).

Таблица 1 – Значения химических сдвигов для аминокислотных остатков белка GB1 в трис-буферном растворе pH 7,4 при $T = 25^\circ\text{C}$

	H	N	C	Ca	Cβ	Cγ	Ha	Hβ	Остальные
10 Met	8.30	119.46	175.89	55.07	34.38	32.42	3.92	1.91	0.79 Hε
11 Lys	8.14	125.68	-	-	-	-	4.44	-	1.35 Hγ, 1.72 Hδ
12 Gln	7.96	118.98	174.89	55.51	30.62	35.02	4.83	1.89	-
13 Tyr	9.04	124.58	174.83	57.16	43.26	-	4.67	2.68, 3.26	-

Продолжение таблицы 1

14 Lys	9.01	122.70	172.75	55.16	35.92	25.31	5.12	1.80, 1.94	-
15 Leu	8.50	126.43	174.51	52.66	42.61	-	-	-	0.63 Hδ
16 Ile	8.97	126.31	174.70	60.19	38.06	27.08, 17.03	4.23	1.87	-
17 Leu	8.60	125.66	174.77	54.37	42.12	25.86	4.39	1.32	-
18 Asn	8.74	125.51	175.32	51.18	38.18	-	5.13	2.44, 2.86	-
19 Gly	7.84	109.89	173.31	44.74	-	-	4.35, 3.93	-	-
20 Lys	9.14	121.20	178.66	59.12	32.49	25.05	3.96	-	1.72 Hδ
21 Thr	8.72	108.75	173.88	62.02	69.67	21.84	-	4.15	1.05 Hγ
22 Leu	7.22	124.88	173.35	55.18	43.53	-	4.03	2.21, 1.93	-
23 Lys	8.03	123.63	-	-	-	-	5.01	-	1.64 Hδ1, 1.79 Hδ2
24 Gly	8.31	109.52	-	45.13	-	-	-	-	-
25 Glu	8.29	118.79	175.24	-	33.77	35.78	5.48	1.85	-
26 Thr	8.64	115.89	171.92	60.63	69.48	19.09	4.62	3.76	0.30 Hγ
27 Thr	7.96	111.97	173.98	59.92	73.28	21.35	5.68	4.22	-
28 Thr	8.88	114.93	171.24	62.30	69.86	-	4.56	3.77	0.37 Hγ1, 4.16 Hγ2
29 Glu	7.85	123.54	-	-	-	-	5.50	1.81	-
30 Ala	9.32	124.49	177.48	51.38	23.46	-	4.77	1.25	-
31 Val	8.63	114.95	174.99	63.27	32.24	21.44, 19.69	4.19	2.04	0.86 Hγ
32 Asp	7.26	115.02	174.49	52.67	42.01	-	-	-	-
33 Ala	-	-	179.13	-	17.49	-	3.26	1.08	-
34 Ala	7.93	120.53	180.80	54.67	17.82	-	3.85	1.18	-
35 Thr	8.17	116.35	176.18	66.95	67.81	21.02	3.60	3.90	-
36 Ala	6.93	123.68	176.97	54.89	17.33	-	3.00	0.39	-
37 Glu	8.27	116.69	177.35	59.65	29.11	35.63	2.53	1.81	-
38 Lys	6.84	116.61	179.85	59.76	32.07	-	3.62	1.72	-
39 Val	7.17	120.61	179.75	65.98	31.83	20.33, 21.67	3.51	1.63	-
40 Phe	8.37	120.75	178.26	56.49	37.32	-	-	-	-
41 Lys	-	-	179.50	59.87	31.48	25.59	4.06	1.50	1.44 Hγ, 1.55 Hδ
42 Gln	7.34	119.63	177.04	58.68	28.10	33.42	3.94	2.12, 1.89	-
43 Tyr	8.15	121.08	179.00	61.89	38.53	-	4.14	3.20	-
44 Ala	9.10	122.67	179.26	56.25	17.76	-	3.70	1.73	-
45 Asn	8.16	117.61	179.28	56.95	38.72	-	4.35	2.83	-

Продолжение таблицы 1

46 Asp	8.83	121.44	177.05	57.15	39.75	-	4.37	2.99, 3.07	-
47 Asn	7.28	116.72	174.00	53.75	39.91	-	4.48	2.00, 2.58	-
48 Gly	7.69	108.20	174.16	46.89	-	-	3.82	-	-
49 Val	8.02	120.88	173.63	61.98	33.05	21.47	4.04	1.63	0.57 H γ , 0.74 H γ
50 Asp	8.38	127.44	174.57	52.40	43.14	-	4.79	2.52, 2.63	-
51 Gly	7.85	107.54	171.75	45.47	-	-	3.65, 4.11	-	-
52 Glu	7.92	120.74	176.84	55.50	31.38	36.24	4.59	1.87, 2.21	-
53 Trp	9.22	128.30	176.89	57.85	30.40	-	5.26	3.04, 3.25	-
54 Thr	9.14	114.52	172.63	60.54	72.16	21.84	4.73	4.13	2.08 H γ
55 Tyr	8.48	120.72	173.14	56.89	41.48	-	4.88	2.40, 2.76	7.27 H δ
56 Asp	7.54	128.40	174.46	51.81	42.87	-	4.49	2.17, 2.48	-
57 Asp	8.43	124.85	177.85	56.30	41.75	-	-	-	-
58 Ala	-	-	179.72	54.99	18.28	-	4.00	1.39	-
59 Thr	6.90	103.28	175.39	60.40	70.13	21.13	4.30	-	1.21 H γ 1, 1.84 H γ 2
60 Lys	7.76	123.56	174.84	57.20	29.76	24.77	4.05	1.91, 2.59	1.21 H γ 1, 1.41 H γ 2
61 Thr	7.24	111.01	174.74	62.25	71.98	20.75	5.37	3.64	5.05 H γ
62 Phe	10.30	131.05	174.53	57.17	42.65	-	5.58	2.93, 3.14	6.72 H δ , 6.75 H ϵ
63 Thr	8.98	116.97	172.58	61.59	71.12	20.54	5.09	4.16	-
64 Val	8.11	123.29	173.29	58.08	32.25	20.34,19.68	4.36	-0.34	-
65 Thr	8.25	123.31	174.42	60.91	70.45	21.19	4.61	3.75	1.05 H γ
66 Glu	8.04	128.71	176.07	56.39	31.81	36.35	4.43	1.94, 2.07	2.32 H γ

На основе определенных экспериментальных данных о величинах химических сдвигов ядер H_N , N_H , C_α , C_β , H_α для аминокислотных остатков белка GB1 были рассчитаны отклонения величин химических сдвигов от средних значений и рассчитан индекс химического сдвига (CSI).

По значениям CSI можно предсказать вторичную структуру белка. Например, если значение химического сдвига протона H_α выходит за пределы диапазона, соответствующего «случайному клубку» (таблица 2), то для этого остатка индекс химического сдвига будет равен «1» или «-1», в

зависимости от величины отклонения (больше или меньше заданного диапазона, соответственно). Если значение химического сдвига H_α не выходит за пределы диапазона, то для аминокислотного остатка индекс химического сдвига берется за «0». Процедура, указанная выше, позволяет определять вторичные элементы в белке [15]. Группа из трех последовательных «-1» и более носит название α -спирального элемента. Группа, состоящая из трех последовательных «1» и более, называется β -складка. Данная методика позволила определить, что в структуре белка GB1 содержится один α -спиральный элемент и четыре β -складки (Рисунок 17).

Таблица 2 – Значения химических сдвигов протонов, используемых при определении вторичной структуры [15]

Аминокислотный остаток	Химический сдвиг α - 1H (ppm)	Аминокислотный остаток	Химический сдвиг α - 1H (ppm)
Ala	4.35 ± 0.10	Met	4.52 ± 0.10
Cys	4.65 ± 0.10	Asn	4.75 ± 0.10
Asp	4.76 ± 0.10	Pro	4.44 ± 0.10
Glu	4.29 ± 0.10	Gln	4.37 ± 0.10
Phe	4.66 ± 0.10	Arg	4.38 ± 0.10
Gly	3.97 ± 0.10	Ser	4.50 ± 0.10
His	4.63 ± 0.10	Thr	4.35 ± 0.10
Ile	3.95 ± 0.10	Val	3.95 ± 0.10
Lys	4.36 ± 0.10	Trp	4.70 ± 0.10
Leu	4.17 ± 0.10	Tyr	4.60 ± 0.10



Рисунок 17 - Предсказание вторичной структуры белка GB1

Заключение

В результате проделанной работы были освоены основы трехмерной ЯМР-спектроскопии, рассмотрены и обработаны трехмерные СВCANH, СВСА(CO)NH, СС(CO)NH, НВНА(CO)NH, HNCA, HNCO, HN(CA)CO, HN(CO)CA и двумерный ^1H - ^{15}N HSQC спектры, изучена литература по исследуемому образцу, выполнено соотнесение сигналов в спектре ЯМР.

По итогам выполненной работы можно сделать следующие выводы:

- Получена таблица химических сдвигов аминокислотной последовательности белка GB1.
- Предсказана вторичная структура белка GB1.

Литература

1. Спирин, А.С. Молекулярная биология: Структура рибосомы и биосинтез белка: учебник для студентов биологических специальностей высших учебных заведений / А.С. Спирин — Москва: Изд-во Высшая школа, 1986. — 496 с. — Текст: непосредственный.
2. Structural Characterization of the Ribosome Maturation Protein, RimM [Текст] / S. Suzuki, A. Tatsuguchi, E. Matsumoto, M. Kawazoe, T. Kaminishi, M. Shirouzu, S. Yokoyama. — Текст: непосредственный // Journal of Bacteriology - 2007. — V. 189. — P. 6397–6406.
3. Гюнтер, Х. Введение в курс спектроскопии ЯМР: учебное пособие / Х.Гюнтер - пер. с англ. — Москва: Изд-во Мир, 1984. — 478 с. — Текст: непосредственный.
4. Томский политехнический университет: сайт. — Томск, 2021. — URL: http://portal.tpu.ru/SHARED/e/ELINE/academic/PCMIB/Tab/text_II.pdf (дата обращения: 02.02.2021). — Текст: электронный
5. Keeler, J. Understanding NMR / J. Keeler, A.J. Pell — New Jersey: Wiley, 2010. — 459 p. — Текст: непосредственный
6. Вах, А. Mlev-17-Based Two-Dimensional Homonuclear Magnetization Transfer Spectroscopy / А. Вах, D.G. Davis — Текст: непосредственный // Journal of Magnetic Resonance. — 1985. — V. 65, № 2. — P. 355-360.
7. Hurd, R. E. Gradient-Enhanced Spectroscopy / R.E., Hurd // Journal of Magnetic Resonance. — 1990. — V. 87, № 2. — P. 422-428.
8. Kover, K. E Gradient - and sensitivity - enhanced TOCSY experiments / K.E. Kover, D. Uhrin, V.J. Hruby — Текст: непосредственный // Journal of Magnetic Resonance. — 1998. — V. 130, № 2. — P. 162-168.
9. Kupce, E. Clean adiabatic TOCSYs // Magnetic Resonance in Chemistry / E. Kupce, W. Hiller — Текст: непосредственный — 2001. — V. 39, № 5. — P. 231-235.

10. Protein NMR: сайт. – 2019. – URL: <https://www.protein-nmr.org.uk/solution-nmr/spectrum-descriptions/> (дата обращения: 18.03.2021). – Текст: электронный
11. Sjobring, U. Streptococcal protein G. Gene structure and protein binding properties / U. Sjobring, L. Bjorck, W. Kastern – Текст: непосредственный // Journal of Biological Chemistry – 1991. - V.266. – P. 399-405.
12. Protein G: сайт. – 2021. – URL: https://etnowiki.ru/wiki/Protein_G (дата обращения: 22.04.2021). – Текст: электронный
13. Cheng, Y. An efficient system for small protein expression and refolding / Y. Cheng, D.J. Patel – Текст: непосредственный // Biochemical and Biophysical Research Communications – 2004. – V.317. – P. 401-405.
14. Expression and purification of human epidermal growth factor (hEGF) fused with GB1 / X. Zheng, X. Wu, X. Fu, D. Dai, F. Wang – Текст: непосредственный // Biotechnology & Biotechnological Equipment – 2016. – V.30, №4, P. 813-818.
15. Wishart, D.S. The Chemical Shift Index: A Fast and Simple Method for the Assignment of Protein Secondary Structure through NMR Spectroscopy / D.S. Wishart, B.D. Sykes, F.M. Richards – Текст: непосредственный – // Biochemistry – 1992. – P.1647-1651.