



УДК 543.422.25:577.322.523

ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА БИНАЗЫ В РАСТВОРЕ ПО ДАННЫМ ^1H -ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

© 1997 г. М. Я. Рейбарх, Д. Е. Нольде, Э. В. Бочаров, Л. И. Васильева,
А. А. Шульга*, М. П. Кирпичников, А. С. Арсеньев#

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

Поступила в редакцию 28.02.97 г. Принята к печати 16.04.97 г.

В двумерных спектрах ^1H -ЯМР гуанилспецифичной рибонуклеазы из *Bacillus intermedius* (биназы) проведено практически полное отнесение сигналов для всех 109 аминокислотных остатков белка. Измерены скорости обмена амидных протонов с растворителем в $^2\text{H}_2\text{O}$ при pH 6.7 и 30°C. Измерены КССВ протонов $\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}$, контакты ЯЭО, скорости обмена амидных протонов с растворителем и индексы химических сдвигов сигналов протонов C^αH , что позволило определить вторичную структуру биназы. Она представляет собой три α -спирали в N-концевой части белка (6–16, 26–31, 41–45) и β -слой из пяти антипараллельных β -тяжей, включающих остатки 51–55, 71–75, 86–90, 95–99 и 104–108. Вторичная структура биназы сравнивается со структурой ее близкого гомолога – барназы из *B. amyloliquefaciens*.

Ключевые слова: белки, рибонуклеазы, вторичная структура, ЯМР.

Биназа, гуанилспецифичная рибонуклеаза, секретируемая штаммом *Bacillus intermedius* 7P [1], состоит из 109 аминокислотных остатков ($M = 12.3$ кДа) и не содержит дисульфидных связей [2]. Биназа обладает высокой термостабильностью в широком диапазоне pH; кроме того, ее денатурация обратима [2]. Эти обстоятельства, а также определенная структурная гомология с другими прокариотическими и эукариотическими РНКазами [3] делают биназу интересным объектом как для белковой инженерии, так и для исследования процессов сборки нативной структуры белка и механизмов катализа на молекулярном уровне. Биназа обладает сильным цитотоксическим действием, поэтому в клетках *Escherichia coli* синтезируется вместе с ингибитором [4]. Природный ингибитор биназы отличается крайне низкой стабильностью, поэтому в клетках *E. coli* ее экспрессия осуществляется одновременно с барстаром [5], природным ингибитором рибонуклеазы из *B. amyloliquefaciens* (барназы) [6, 7]. Биназа и барназа – структурные и функциональные аналоги: гомология их первичной структуры составляет 85%, оба фермента проявляют высокую гуанилспецифичность на коротких фрагментах РНК

и более низкую специфичность при гидролизе фрагментов длиной больше 5 нуклеотидов [4], специфично взаимодействуют с барстаром [8]. При этом барназа обладает вдвое меньшей каталитической активностью (на динуклеотидах) и примерно на порядок большей константой связывания с барстаром [5].

К настоящему времени методом ЯМР в растворе исследованы пространственные структуры барназы [7] и мутанта барстара (с двумя заменами Cys на Ala) [9]. Предпринимались попытки исследовать в растворе методом ЯМР комплекс барназа–барстар [10]. Полученные при этом данные в общем не противоречат рентгеноструктурной модели комплекса [11]. Было бы весьма интересным сравнить пространственную структуру активных центров и барстарсвязывающих центров барназы и биназы для выявления как сходных черт, обуславливающих функции этих РНКаз и их специфичность к своему общему ингибитору, так и различий, которые определяют разницу в каталитических константах и константах связывания с барстаром. Для решения этих задач требуется определение пространственной структуры ферментов в растворе и изучение конформационных изменений, происходящих под влиянием различных лигандов.

Настоящая работа посвящена отнесению сигналов в спектрах ^1H -ЯМР биназы в растворе и анализу ее вторичной структуры и представляет первый этап работы по исследованию пространственной структуры биназы и комплекса биназа–барстар в растворе.

Сокращения: 2D – двумерный, ЯЭО – ядерный эффект Оверхаузера, DQF-COSY – корреляционная спектроскопия с использованием двухквантового фильтра, TOCSY – тотальная корреляционная спектроскопия, NOESY – спектроскопия ЯЭО.

Автор для переписки.

Отнесение сигналов спиновых систем протонов аминокислотных остатков. Отнесение сигналов в спектрах ЯМР биназы проводилось по классической схеме [12] на основе анализа спектров DQF-COSY, TOCSY и NOESY и включало два этапа: выделение и анализ связанных спиновых систем с целью отнесения сигналов к определенному типу аминокислотных остатков и последовательное отнесение, т.е. отнесение сигналов к определенному положению остатков в первичной структуре. Как правило, для этого использовались спектры, полученные при 30°C, но в трудных случаях, связанных с совпадением химических сдвигов сигналов от нескольких протонов, использовались также спектры при 10 и 45°C. На первом этапе были идентифицированы все кросс-пики NH/C^αH-области спектра DQF-COSY в H₂O. Далее кросс-пики NH/C^αH в спектрах TOCSY в H₂O связывали со спиновыми системами протонов боковых цепей остатков, которые делились на три категории: системы, которые можно сразу отнести к остатку определенного типа, AMX-системы и все другие спиновые системы, которые представляют собой остатки с длинными боковыми цепями [12]. Отнесения сигналов протонов, принадлежащих выделенным спиновым системам, были продолжены в алифатической области спектров DQF-COSY и TOCSY, а для отнесения AMX-систем анализировались также спиновые системы, найденные в ароматической области спектров.

К первой категории спиновых систем принадлежат остатки Gly, Ala, Thr, Ser, Val, Ile и Leu, каждый из которых однозначно отождествляется с определенной спиновой системой исходя из характерного расположения кросс-пигов, химических сдвигов и мультиплетной структуры сигналов [12].

Спиновые системы 9 остатков Gly отнесены с учетом большой геминальной константы спин-спинового взаимодействия (KCCB) протонов C^αH и наличия в спектрах DQF-COSY или TOCSY кросс-пигов одного протона NH с двумя протонами C^αH. Остатки Ala и Thr характеризуются наличием в спектрах TOCSY интенсивных кросс-пигов с протоном NH на метильную группу, а также, в случае остатков Thr, наличием расположенных в спектрах DQF-COSY и TOCSY близко к диагонали кросс-пигов C^αH/C^βH. Таким образом были идентифицированы 10 из 11 Ala (кроме N-концевого остатка) и 7 остатков Thr, хотя для одного из них химический сдвиг C^βH-протона совпадал при 30°C с сигналом от H₂O. Однако в спектрах NOESY и TOCSY при 45°C эти сигналы оказались на разных частотах. 8 из 10 остатков Ser были идентифицированы как спиновые системы AMX, у которых химические сдвиги сигналов алифатических протонов больше 3.4 м. д. Сигналы остальных двух остатков были обнаружены лишь при последовательном отнесении сигналов, поскольку химические сдвиги сигналов двух протонов C^βH Ser79 совпадают, а сигналы обоих прото-

нов C^βH Ser90 имеют аномально маленький химический сдвиг (см. таблицу).

Кросс-пики C^αH/C^βH 7 остатков Val и 4 из 7 остатков Ile, находящиеся далеко от диагонали, найдены исходя из того, что α-протон валина должен образовывать только один кросс-пик с β-протоном. У всех остатков валина разница в химических сдвигах сигналов метильных групп оказалась небольшой (см. таблицу). Часть спиновых систем 3 остатков Ile идентифицирована в спектре DQF-COSY по характерной тройке кросс-пигов: C^βH/C^γH₃ и два C^γH₂/C^δH₃. Полностью отнесение сигналов протонов спиновых систем этих трех остатков Ile было получено только при анализе спектра NOESY в процессе последовательного отнесения сигналов.

Спиновые системы протонов 5 из 7 остатков Leu идентифицированы при совместном анализе спектров DQF-COSY и TOCSY с учетом характерных пар симметричных кросс-пигов C^γH/C^δH₃ в сильнополюсной области спектра. Для остальных 2 остатков Leu в спектрах DQF-COSY и TOCSY были найдены системы кросс-пигов NH/C^αH/C^βH₂ и C^γH/(C^δH₃)₂. Они были связаны в единые спиновые системы при анализе спектров NOESY в процессе последовательного отнесения сигналов.

Вторая категория спиновых систем включает остатки Asp, Asn, Tyr, Phe, His и Trp (в биназе отсутствуют остатки Cys). Кросс-пики алифатических протонов этих остатков идентифицируются как типичные AMX-спиновые системы [12], т.е. системы, у которых химические сдвиги протонов C^βH находятся в более слабом поле (больше 2.5 м. д.), чем у остатков с длинными боковыми цепями. В биназе присутствует 29 остатков данного типа, при этом на первом этапе было идентифицировано 25 AMX-спиновых систем. Дальнейшая идентификация остатков этой группы проводилась после анализа спиновых систем ароматических и амидных протонов боковых цепей.

В слабополюсной (ω₁, ω₂ > 6 м. д.) области спектров TOCSY присутствуют только сигналы ароматических и амидных протонов боковых цепей. При этом кросс-пики между амидными протонами имеют среднюю интенсивность в спектрах TOCSY, отсутствуют в спектре DQF-COSY и очень интенсивны в спектрах NOESY. Из 7 NH₂-групп биназы (6 остатков Asn и 1 Gln) идентифицировано 6; из них 5 в спектрах NOESY давали кросс-пики на протоны C^βH AMX-спиновых систем, которые поэтому были идентифицированы как остатки Asn.

Спиновая система протонов имидазольного кольца единственного в биназе остатка His была идентифицирована по характерно узкому кросс-пику C^δ2H/C^ε1H в ароматической области спектров TOCSY и затем соотнесена с AMX-системой протонов гистидина на основании кросс-пика C^δ2H/C^βH₂ в спектре NOESY. Для спиновых систем остатков Trp характерно наличие двух кросс-пигов в слабополюсной области спектра NOESY

Химические сдвиги сигналов протонов и КССВ $^3J_{\text{HN}, \text{C}^\alpha\text{H}}$ биназы в H₂O (pH 6.7, 30°C)

Остаток	Химический сдвиг, м. д.				$^3J_{\text{HN}, \text{C}^\alpha\text{H}}^*$, Гц
	NH	C ^α H	C ^β H	Другие протоны	
Ala1	–	4.08	1.13		–
Val2	8.44	3.95	1.86	C ^γ H ₃ 0.83, 0.77	
Ile3	7.91	4.24	1.72	C ^γ 1H 1.53, 1.03; C ^γ 2H ₃ 0.81; C ^δ H ₃ 0.88	9.5
Asn4	8.02	5.01	3.82, 1.95	N ^δ H 7.18, 6.47	3.8
Thr5	7.16	4.62	4.75	C ^γ H ₃ 1.40	3.0
Phe6	8.78	4.02	3.07, 2.95	C ^δ H 7.42; C ^ε H 7.42; C ^ζ H 7.42	4.1
Asp7	8.63	4.39	2.66, 2.52		4.0
Gly8	7.90	3.68, 3.89			–
Val9	8.80	3.48	1.92	C ^γ H ₃ 1.17, 0.58	6.0
Ala10	8.00	3.98	1.56		5.4
Asp11	8.15	4.39	2.82, 2.61		5.0
Tyr12	7.85	4.04	3.25, 3.25	C ^δ H 7.39, 7.39; C ^ε H 6.44, 6.44	5.2
Leu13	8.72	3.87	2.04, 1.15	C ^γ H 1.42; C ^δ H ₃ 0.21, 0.19	4.1
Ile14	7.70	3.29	1.93	C ^γ 1H 1.67, 1.36; C ^γ 2H ₃ 0.76; C ^δ H ₃ 0.86	5.5
Arg15	7.60	3.70	1.34, 0.98	C ^γ H 0.90, 0.44; C ^δ H 2.76, 2.76	5.5
Tyr16	8.65	4.35	2.85, 2.31	C ^δ H 6.25, 6.25; C ^ε H 6.49, 6.49	9.6
Lys17	8.14	3.49	1.94, 1.92	C ^γ H 0.82, 0.43; C ^δ H 1.24, 0.93; C ^ε H 2.58, 2.53	8.5
Arg18	7.48	4.55	2.16, 1.93	C ^γ H 1.54, 1.44; C ^δ H 3.23, 3.23; N ^ε H 7.19	6.3
Leu19	8.29	4.21	1.67, 1.25	C ^γ H 1.54; C ^δ H ₃ 0.61, 0.11	5.7
Pro20	–	3.98	2.18, 1.26	C ^γ H 2.27, 1.27; C ^δ H 3.51, 3.32	–
Asp21	8.48	4.39	2.77, 2.69		5.1
Asn22	8.66	4.49	3.11, 2.42	N ^δ H 7.20, 6.51	7.3
Tyr23	7.39	5.29	2.73, 2.54	C ^δ H 6.79, 6.79; C ^ε H 7.19, 7.19	9.4
Ile24	9.09	4.85	1.88	C ^γ 1H 1.34, 0.79; C ^γ 2H ₃ 0.75; C ^δ H ₃ 0.42	9.7
Thr25	8.42	4.42	5.04	C ^γ H ₃ 1.30	7.9
Lys26	10.46	3.83	2.16, 1.97	C ^γ H 1.44, 1.44; C ^δ H 1.77, 1.77; C ^ε H 2.94, 2.94	4.9
Ser27	9.19	4.31	3.98, 3.92		5.6
Gln28	7.70	4.08	2.48, 2.42	C ^γ H 1.91, 1.91; N ^ε H 7.52, 6.91	4.3
Ala29	8.88	3.83	1.10		4.2
Ser30	9.29	4.79	4.25, 4.15		5.9
Ala31	7.88	4.26	1.59		6.3
Leu32	7.36	4.40	1.96, 1.66	C ^γ H 1.88; C ^δ H ₃ 0.93, 0.83	8.5
Gly33	7.75	4.53, 3.73			–
Trp34	8.25	4.59	2.80, 2.60	N ^ε 1H 9.61; C ^δ 1H 7.08; C ^ε 3H 7.44; C ^ζ 3H 7.05; C ^η 2H 7.18; C ^ζ 2H 7.33	5.2
Val35	8.62	3.46	1.54	C ^γ H ₃ 0.82	11.0
Ala36	8.07	3.70	1.19		6.0
Ser37	7.17	3.85	4.04, 3.88		
Lys38	7.72	4.46	1.68, 1.68	C ^γ H 1.36, 1.36; C ^δ H 1.55, 1.55; C ^ε H 2.95, 2.95	5.1
Gly39	7.60	3.52, 2.33			–
Asn40	7.44	4.85	3.37, 2.37	N ^δ H 7.98, 6.67	8.7
Leu41	7.96	3.82	2.14, 0.94	C ^γ H 1.40; C ^γ H ₃ 0.17, 0.07	5.1
Ala42	8.11	4.18	1.57		4.6
Gly43	7.28	4.18	2.14, 2.14	C ^γ H 2.25, 2.25	

Таблица. (Продолжение)

Оста- ток	Химический сдвиг, м. д.				$^3J_{\text{NH}, \text{C}^\alpha\text{H}, \text{C}^\beta\text{H}}^*$, Гц
	NH	C $^\alpha$ H	C $^\beta$ H	Другие протоны	
Val44	7.27	4.39	2.41	C $^\gamma$ H ₃ 0.88, 0.84	
Ala45	8.42	4.61	1.01		9.1
Pro46	–	4.38	2.33, 1.87	C $^\gamma$ H 2.00, 1.87; C $^\delta$ H 3.43, 3.23	–
Gly47	8.57	4.06, 3.69			–
Lys48	7.87	5.16	1.91, 1.91	C $^\gamma$ H 1.45, 1.45; C $^\delta$ H 1.09, 1.09	9.7
Ser49	8.14	4.43	3.41, 2.59	O $^\gamma$ H 5.33	6.1
Ile50	8.49	4.89	1.43	C $^\gamma$ H 0.68, 0.60; C $^\gamma$ H ₃ 0.78; C $^\delta$ H ₃ –0.51	8.1
Gly51	9.09	4.86, 4.03			–
Gly52	9.82	4.38, 3.85			–
Asp53	8.97	4.78	2.88, 2.73		7.2
Val54	8.31	4.08	1.96	C $^\gamma$ H ₃ 1.08, 0.91	4.7
Phe55	8.91	4.75	2.65, 2.53	C $^\delta$ H 6.74, 6.74; C $^\epsilon$ H 6.33, 6.33; C $^\zeta$ H 6.94	10.4
Ser56	8.88	3.85	3.07, 2.95		
Asn57	6.97	3.92	3.13, 1.62	N $^\delta$ H 7.52, 6.97	
Arg58	7.76	3.80	1.66, 1.66	C $^\gamma$ H 1.46, 1.46; C $^\delta$ H 3.11, 3.11	9.8
Gly59	8.21	4.20	2.15, 1.94	C $^\gamma$ H 2.29, 2.29	6.6
Gly60	7.58	3.80, 3.57			–
Arg61	8.03	3.96	1.68, 1.66	C $^\gamma$ H 1.86, 1.86; C $^\delta$ H 3.26, 3.34	7.5
Leu62	7.50	3.95	0.05, –0.19	C $^\gamma$ H –0.19; C $^\delta$ H ₃ –1.19, –1.34	9.7
Pro63	–	4.35	2.33, 1.91	C $^\gamma$ H 2.23, 2.23; C $^\delta$ H 3.43, 3.14	–
Ser64	8.60	4.95	3.83, 3.80		
Ala65	8.20	4.46	1.25		5.1
Ser66	8.16	4.39	3.25, 3.12		
Gly67	8.25	3.65, 3.14			–
Arg68	7.77	4.09	1.81, 1.68	C $^\gamma$ H 1.04, 1.04; C $^\delta$ H 2.77, 2.77; N $^\epsilon$ H 8.42	7.2
Thr69	8.17	4.46	4.05	C $^\gamma$ H ₃ 1.16	9.8
Trp70	9.07	4.92	3.45, 2.96	N $^\epsilon$ H 8.91; C $^\delta$ H 7.10; C $^\epsilon$ H 7.14; C $^\zeta$ H 7.01; C $^\eta$ H 7.01; C $^\xi$ H 7.58	7.5
Arg71	8.73	5.08	1.26, 0.36	C $^\gamma$ H 1.57, 1.57; C $^\delta$ H 2.90, 2.83	9.6
Gly72	8.23	5.93	2.28, 2.05	C $^\gamma$ H 2.64, 2.64	11.1
Ala73	9.09	5.13	1.25		8.0
Asp74	9.59	4.88	3.45, 2.45		6.5
Ile75	7.67	4.22	0.93	C $^\gamma$ H 1.47, 1.07; C $^\gamma$ H ₃ –0.29; C $^\delta$ H ₃ 0.36	10.3
Asn76	8.74	4.06	3.39, 2.99	N $^\delta$ H 8.68, 6.21	8.7
Tyr77	8.97	4.10	3.08, 3.08	C $^\delta$ H 6.70, 6.70; C $^\epsilon$ H 7.09, 7.09	5.4
Val78	7.96	3.55	1.66	C $^\gamma$ H ₃ 0.75, 0.70	11.7
Ser79	7.08	4.39	3.69, 3.69		6.4
Gly80	8.69	4.53, 3.99			–
Phe81	8.88	4.44	3.43, 3.06	C $^\delta$ H 7.55, 7.55; C $^\epsilon$ H 7.42, 7.42; C $^\zeta$ H 7.21	6.7
Arg82	7.77	4.32	2.34, 1.81	C $^\gamma$ H 1.36, 1.05; C $^\delta$ H 3.59, 3.14; N $^\epsilon$ H 9.74	5.2
Asn83	8.85	4.87	3.13, 2.53		9.4
Ala84	8.25	4.28	1.34		8.6
Asp85	7.56	5.55	3.21, 2.22		
Arg86	9.35	5.56	1.54, 1.54	C $^\gamma$ H 0.62, 0.62	9.5
Leu87	9.32	5.54	1.76, 1.68	C $^\gamma$ H 1.94; C $^\delta$ H ₃ 1.12, 1.04	

Таблица. (Окончание)

Оста- ток	Химический сдвиг, м. д.				$^3J_{\text{HN}, \text{C}^\alpha\text{H}}^*$, Гц
	NH	C $^\alpha$ H	C $^\beta$ H	Другие протоны	
Val88	9.36	5.57	1.66	C $^\gamma$ H ₃ 0.63, 0.37	
Tyr89	9.36	6.47	2.89, 2.87	C $^\delta$ H 6.73, 6.57; C $^\epsilon$ H 6.52, 6.21	
Ser90	9.20	4.92	2.98, 1.38	O $^\gamma$ H 5.39	8.4
Ser91	8.06	3.50	3.88, 3.62		4.2
Asp92	8.05	4.33	2.96, 2.43		9.0
Trp93	7.18	4.05	3.41, 3.33	N $^\epsilon$ H 10.01; C $^\delta$ H 7.04; C $^\epsilon$ H 7.20; C $^\zeta$ H 6.77; C $^\eta$ H 6.91; C $^\xi$ H 7.52	8.5
Leu94	8.13	4.60	2.06, 1.58	C $^\gamma$ H 1.60; C $^\delta$ H ₃ 0.96, 0.87	8.9
Ile95	8.56	5.36	1.77	C $^\gamma$ H 1.87, 1.30; C $^\gamma$ H ₃ 1.08; C $^\delta$ H ₃ 0.97	9.9
Tyr96	10.00	5.43	2.89, 2.71	C $^\delta$ H 6.95, 6.95; C $^\epsilon$ H 6.85, 6.85	10.0
Lys97	9.47	5.66	1.54, 1.39	C $^\gamma$ H 1.16, 0.89; C $^\delta$ H 0.51, 0.51	10.0
Thr98	8.86	4.94	3.85	C $^\gamma$ H ₃ 1.02; O $^\gamma$ H 5.15	8.8
Thr99	8.94	5.37	4.70	C $^\gamma$ H ₃ 1.11	11.3
Asp100	8.47	4.69	2.98, 2.32		9.7
His101	9.07	2.95	3.72, 2.52	C $^\epsilon$ H 8.61; C $^\delta$ H 6.39	7.5
Tyr102	7.67	3.10	3.41, 3.41	C $^\delta$ H 6.69, 6.69; C $^\epsilon$ H 6.96, 6.96	8.6
Ala103	7.37	4.15	1.36		4.2
Thr104	9.77	4.49	4.05	C $^\gamma$ H ₃ 1.12	10.0
Phe105	8.56	5.72	3.00, 2.69	C $^\delta$ H 6.82, 6.82; C $^\epsilon$ H 6.97, 6.97; C $^\zeta$ H 7.09	11.1
Thr106	8.99	4.61	3.72	C $^\gamma$ H ₃ 1.16	9.0
Arg107	9.23	3.52	1.59, 1.59	C $^\gamma$ H 1.05, 1.05	7.3
Ile108	9.14	4.75	1.96	C $^\gamma$ H 1.28; C $^\gamma$ H ₃ 0.81; C $^\delta$ H ₃ 0.82	10.3
Arg109	8.29	4.36	1.97, 1.77	-	8.1

* Из-за перекрытия сигналов для некоторых амидных протонов KCCB $^3J_{\text{HN}, \text{C}^\alpha\text{H}}$ не измерены.

(N $^\epsilon$ H/C $^\delta$ H и N $^\epsilon$ H/C $^\xi$ H), причем кросс-пик N $^\epsilon$ H/C $^\delta$ H присутствует в спектрах TOCSY и DQF-COSY. Для всех 3 остатков Trp были найдены соответствующие кросс-пики, по спектрам DQF-COSY и TOCSY построены спиновые системы (C $^\zeta$ H-C $^\eta$ H-C $^\zeta$ H-C $^\epsilon$ H) и по наличию кросс-пиков ЯЭО протонов C $^\delta$ H/C $^\beta$ H₂ и C $^\epsilon$ H/C $^\beta$ H₂ спиновые системы ароматических протонов соотносены с АМХ-системами. Кроме этого в ароматической области удалось выделить еще 8 спиновых систем: 5 остатков Tyr, 2 остатка Phe и одну нехарактерную для белков спиновую систему, которая на этом этапе осталась неотнесенной (см. ниже). Для 2 остатков Tyr и 1 остатка Phe были однозначно соотносены АМХ- и ароматические спиновые системы. Другим 3 остаткам Tyr соответствовали АХ₂-спиновые системы (химические сдвиги протонов C $^\beta$ H₂ совпали). Со вторым остатком Phe были соотносены две АМХ-системы, что, как выяснилось после соотношения всех других спиновых систем в ароматической области, объясняется перекрытием сигналов двух ароматических спиновых систем. На этапе последо-

вательного отнесения было показано, что перекрываются сигналы протонов ароматических спиновых систем Tyr96 и Phe105. Химические сдвиги сигналов ароматических протонов Phe оказались близки и были найдены по кросс-пикам ЯЭО АМХ-системы в характерной для сигналов ароматических протонов области спектра. Таким образом, осталось не отнесено 9 АМХ-систем, которым соответствовали 8 остатков Asp и 1 остаток Asn. На этапе последовательного отнесения выяснилось, что не были найдены сигналы спиновой системы остатка Asp40 (совпадали химические сдвиги протонов C $^\beta$ H₂) и сигналы амидной группы боковой цепи остатка Asn83, а одному из остатков Ser соответствует АМХ-система с аномально маленькими химическими сдвигами сигналов протонов C $^\beta$ H₂.

К третьему классу спиновых систем относятся аминокислотные остатки с длинными боковыми цепями: остатки Glu, Gln, Pro, Arg и Lys (биназа не содержит остатков Met). Идентификация кросс-пиков протонов C $^\alpha$ H/C $^\beta$ H этих остатков часто затруднена по сравнению с АМХ-системами, так

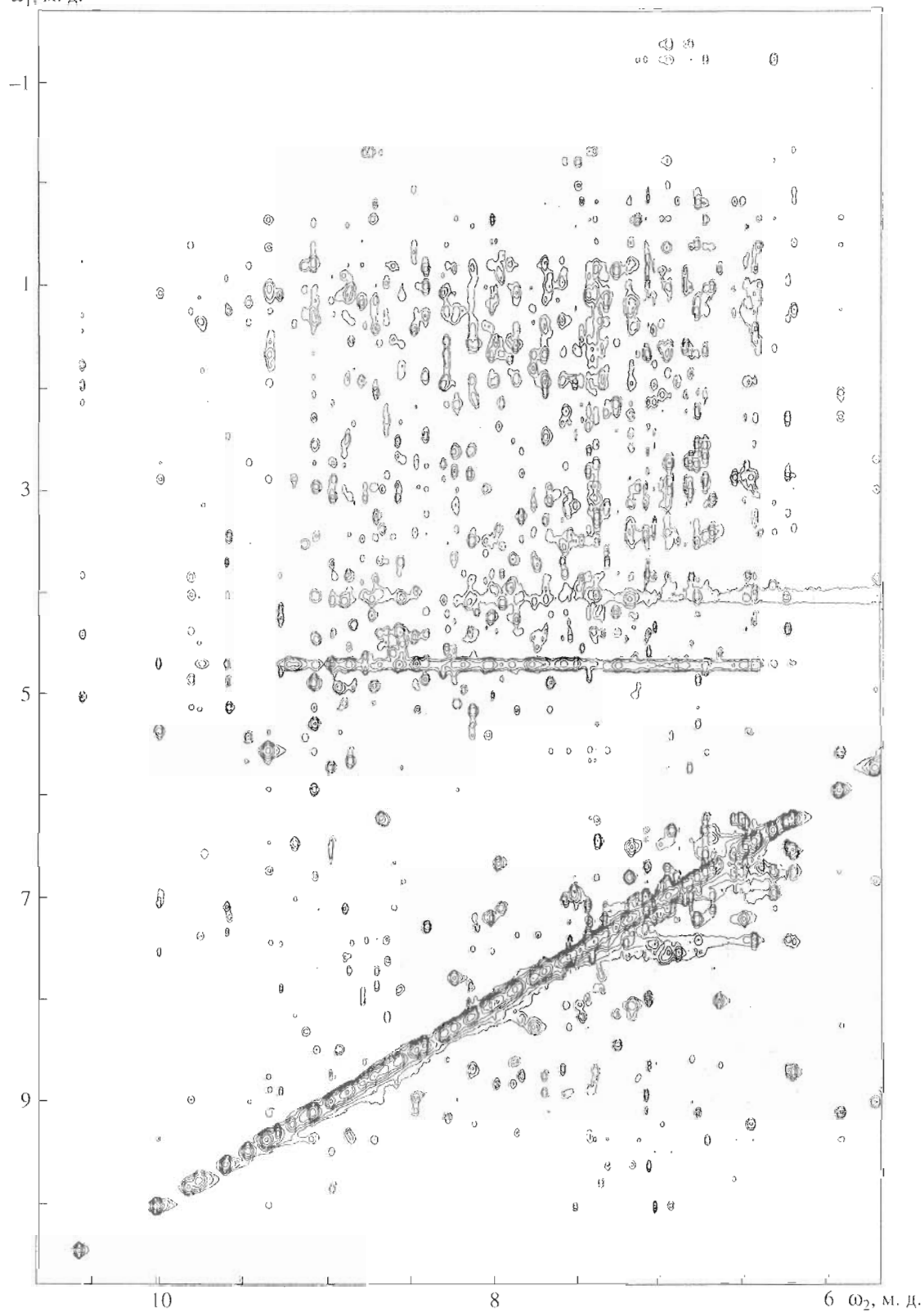
ω_1 , М. Д.

Рис. 1. Область кросс-пиков протонов НН спектра NOESY ($\tau_m = 100$ мс) биназы в H_2O (30°C, pH 6.7).



Рис. 2. Аминокислотная последовательность биназы, карта d -связей с участием протонов NH ($\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ в случае Pro), $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ и C^{β}H , КССВ ${}^3J_{\text{NH},\text{C}^{\alpha}\text{H}}$, скорости обмена протонов Nh с растворителем и индексы химических сдвигов сигналов протонов $\text{C}^{\alpha}\text{H}$. В светлых прямоугольниках указаны спиральные участки, а в серых – участки, соответствующие β -тяжам. Высота черных прямоугольников соответствует интенсивности кросс-пиков ЯЭО (кружком отмечены неоднозначные d -связи, наличие соответствующих им кросс-пиков возможно, но не доказано). В строке “ ${}^3J_{\text{NH},\text{C}^{\alpha}\text{H}}$ ” белым кружком обозначены остатки, для которых ${}^3J_{\text{NH},\text{C}^{\alpha}\text{H}} < 6$ Гц, и черным кружком – ${}^3J_{\text{NH},\text{C}^{\alpha}\text{H}} > 8$ Гц. В строке “H/D-обмен” белыми, серыми и черными кружками обозначены остатки, NH-протоны которых имеют время полуобмена с растворителем в диапазонах 5–60 мин, 1–30 ч и более 30 ч соответственно. В строке “Индекс” “–”, “0” и “+” обозначают остатки, химический сдвиг сигналов протонов $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ которых характерен для спиральной, неупорядоченной или β -структурной конформаций соответственно (см. “Экспер. часть”).

как сигналы протонов C^{β}H находятся в той же области спектра, что и сигналы протонов $\text{C}^{\gamma}\text{H}$, т.е., как правило, в области с более сильным полем, чем 2.3 м. д. Спиновые системы протонов боковых цепей 6 из 10 остатков Arg и 4 из 5 остатков Lys в биназе были установлены при анализе кросс-пиков между протоками $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ и алифатическими протонами боковых цепей в спектрах TOCSY с временами смешивания 40 и 80 мс. Для еще 3 остатков Arg химические сдвиги сигналов протонов $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ и $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ были найдены при анализе спектра NOESY, поскольку в спектрах TOCSY сигналы $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2/\text{NH}$ и $\text{C}^{\delta}\text{H}_2/\text{NH}$ для этих остатков отсутствовали. Химические сдвиги сигналов всех протонов остатка Lys26 были определены при анализе спектра NOESY, так как в спектрах TOCSY кросс-лики с протона NH этого остатка вообще не наблюдались. Для C-концевого остатка аргинина сигналы протонов $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ и $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ отсутствовали во всех спектрах.

Спиновые системы 3 остатков Gln и 1 остатка Gln были установлены по наличию в спектре TOCSY системы кросс-пиков $\text{NH}/\text{C}^{\alpha}\text{H}/\text{C}^{\beta}\text{H}_2/\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ и по отсутствию других кросс-пиков как в спектрах TOCSY, так и в спектре DQF-COSY. Спиновая система единственного остатка Gln была выбрана из этих спиновых систем исходя из наличия в спектрах NOESY кросс-пиков ЯЭО между протонами $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ и протонами амидной группы боковой цепи.

Стратегия отнесения сигналов остатков пролина сильно отличается от обычной ввиду отсутствия у этих остатков NH-протона. Отнесение сигналов пролина начинали с нахождения в спектре DQF-COSY интенсивных кросс-пиков между двумя протонами $\text{C}^{\delta}\text{H}$ с типичными химическими сдвигами сигналов в диапазоне 3.4–4.0 м. д. и далее продолжали, используя комбинацию спектров DQF-COSY и TOCSY. Таким образом были выделены все три спиновые системы остатков пролина.

Последовательное отнесение сигналов спиновых систем протонов. Последовательное отнесение сигналов протонов базировалось на анализе $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$, $d_{\beta\text{N}}(i, i+1)$ и $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ -связей между протонами NH (или протонами $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ в случае пролинов) ($i+1$)-го остатка и соответственно протонами $\text{C}^{\alpha}\text{H}$, C^{β}H и NH предыдущего по аминокислотной последовательности i -го остатка. В основном использовался спектр NOESY (τ_m 100 мс, рис. 1), снятый в H_2O при 30°C , а в случаях совпадения химических сдвигов сигналов протонов NH, принадлежащих разным остаткам белка, или совпадения сигналов протонов белка и растворителя использовались спектры NOESY 100 и 200 мс при 10 и 45°C . Найденные d -связи суммированы на рис. 2. В итоге удалось провести практически полное отнесение всех протонов белка (см. таблицу). Полученные значения химических сдвигов несколько отличаются от полученных ранее [13] при тех же условиях, за исключением значения рН, равного 5.0, причем для некоторых протонов отличия весьма значительны. Например, для сигнала протона NH Gly67 разница химических сдвигов, наблюдавшихся в данной работе (см. таблицу) и приведенных в [13], составляет 0.75 м. д.

Отнесение сигналов ароматических протонов Tug89. После проведения последовательного отнесения сигналов протонов биназы в двумерных (2D) спектрах ^1H -ЯМР нами была также отнесена "неизвестная" спиновая система, найденная ранее в ароматической области спектра. Эта система состоит из четырех протонов (точнее, ее протоны имеют четыре несовпадающих значения химических сдвигов), и все они дают кросс-пики ЯЭО с протонами $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Tug89. При этом сигналы ароматических протонов Tug89 до этого не были найдены. Обычно ароматические кольца остатков Tug вращаются достаточно быстро, и поэтому в спектрах ^1H -ЯМР белков наблюдаются только два сигнала (от пар протонов $\text{C}^{\delta}\text{H}$, $\text{C}^{\delta}\text{H}$ и $\text{C}^{\epsilon}\text{H}$, $\text{C}^{\epsilon}\text{H}$). Интересно, что, хотя в спектрах NOESY присутствуют кросс-пики между всеми четырьмя протонами, зависимость их интенсивности от температуры разная (рис. 3). Кроме кросс-пигов ЯЭО в спектрах NOESY могут присутствовать так называемые обменные кросс-пики. Они возникают при наличии обмена между несколькими конформационными формами, и положение одного кросс-пика соответствует химическим сдвигам этого протона в двух формах. Для белков такого размера, как биназа, обменные кросс-пики имеют тот же знак, что и кросс-пики ЯЭО, но в отличие от последних, уменьшающихся при увеличении температуры, интенсивность обменных кросс-пигов пропорциональна скорости обмена и поэтому возрастает при увеличении температуры.

Как видно из рис. 3, кросс-пики, отмеченные штриховыми линиями, являются обменными, т.е.

ароматическое кольцо Tug89 участвует в медленных (в миллисекундном диапазоне времени) движениях. Такая картина кросс-пигов в спектрах NOESY может наблюдаться в двух случаях. Во-первых, когда вращение ароматического кольца вокруг связи $\text{C}^{\beta}\text{—C}^{\gamma}$ медленное. В этом случае химические сдвиги всех четырех протонов кольца неэквивалентные и наблюдаются интенсивные кросс-пики ЯЭО ($\text{C}^{\delta}\text{H}/\text{C}^{\epsilon}\text{H}$ и $\text{C}^{\delta}\text{H}/\text{C}^{\epsilon}\text{H}$), обменные кросс-пики ($\text{C}^{\delta}\text{H}/\text{C}^{\delta}\text{H}$ и $\text{C}^{\epsilon}\text{H}/\text{C}^{\epsilon}\text{H}$), а также кросс-пики, обусловленные суммарным эффектом ЯЭО и обменного процесса ($\text{C}^{\delta}\text{H}/\text{C}^{\epsilon}\text{H}$ и $\text{C}^{\delta}\text{H}/\text{C}^{\delta}\text{H}$). Во-вторых, возможно, что в растворе присутствуют две формы биназы, различающиеся конформацией одного или нескольких остатков вблизи Tug89. При этом ароматическое кольцо в обеих формах вращается свободно, а в спектре видны кросс-пики между парами эквивалентных протонов $\text{C}^{\delta}\text{H}/\text{C}^{\epsilon}\text{H}$ для каждой формы, обменные кросс-пики между протонами $\text{C}^{\delta}\text{H}$ и $\text{C}^{\epsilon}\text{H}$ для обеих форм, а также кросс-пики, обусловленные суммарным эффектом ЯЭО и обменного процесса. Учитывая, что положения ароматических колец в молекулах белков существенно влияют на химические сдвиги близлежащих протонов, во втором случае можно ожидать наличия двух сигналов и для других протонов, сближенных с ароматическим кольцом Tug89. Такая ситуация, однако, не была обнаружена ни для каких протонов биназы. Кроме того, наличие кросс-пигов ЯЭО протонов боковых цепей остатков Leu13, Leu19 и Ile95 и протонов ароматического кольца остатка Tug89 свидетельствует о плотной гидрофобной упаковке ароматического кольца, что делает логичным предположение о его замедленном вращении. Из зависимости интенсивности обменных кросс-пигов от времени смешивания в спектрах NOESY можно оценить скорость вращения ароматического кольца. По нашим оценкам, она находится в пределах $1\text{--}10\text{ с}^{-1}$ (при 30°C).

Вторичная структура биназы. Исходя из анализа d -связей, $\text{KCCB } ^3J_{\text{HN}, \text{C}^{\alpha}\text{H}}$ и скоростей обмена амидных протонов с растворителем можно определить вторичную структуру белка. Согласно [12], участки полипептидной цепи со средними по интенсивности кросс-пиками ЯЭО $\text{C}^{\alpha}\text{H}(i)/\text{NH}(i+1)$ и $\text{C}^{\alpha}\text{H}(i)/\text{NH}(i+3)$, интенсивными кросс-пиками ЯЭО $\text{NH}(i)/\text{NH}(i+1)$, а также маленькими $\text{KCCB } ^3J_{\text{HN}, \text{C}^{\alpha}\text{H}} (< 6\text{ Гц})$ соответствуют спиральям. В биназе найдено три спиральных участка полипептидной цепи: 6–16, 26–31 и 41–45. Участок 6–16 является α -спиралью, так как на этом участке есть кросс-пики ЯЭО $\text{C}^{\alpha}\text{H}(i)/\text{NH}(i+4)$ (рис. 2), обычно не наблюдаемые для 3_{10} -спиралей. Точная конформация двух других спиральных участков белка (26–31 и 41–45) будет выяснена при расчете пространственной структуры биназы. Исхо-

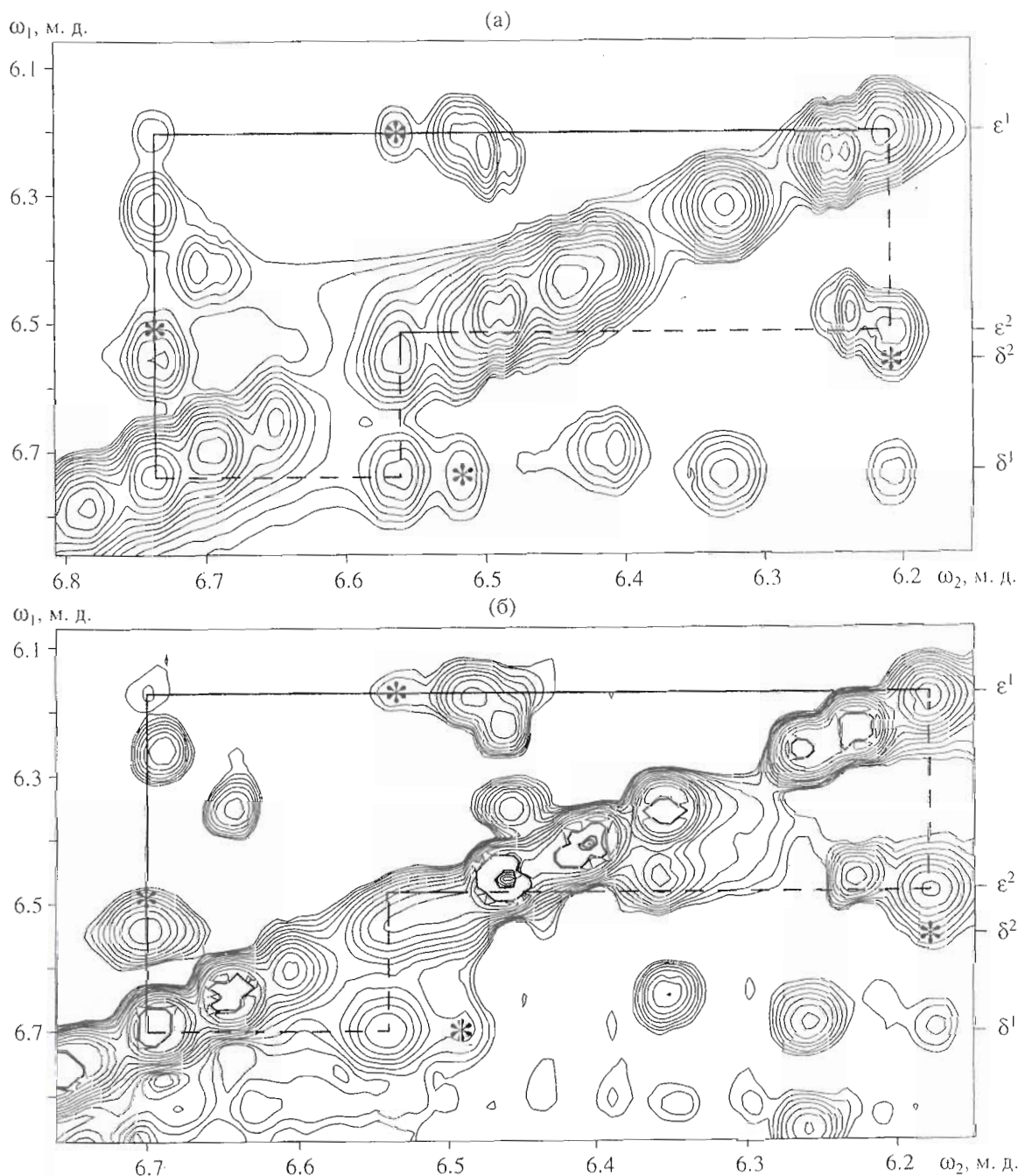


Рис. 3. Область ароматических протонов Tug89 биназы в спектрах NOESY ($\tau_m = 100$ мс) при 30 (а) и 45°C (б). Сплошными линиями отмечены кросс-пики ЯЭО δ^1/ϵ^1 и δ^2/ϵ^2 , штриховыми – обменные кросс-пики. Кросс-пики, обусловленные суммарным эффектом ЯЭО и обменного процесса (δ^1/ϵ^2 и δ^2/ϵ^1) помечены звездочкой.

для из данных дейтерообмена (рис. 2) α -спираль 6–16 (кроме ближайшего к N-концу витка) более стабильна, чем две другие спирали. Об этом также свидетельствуют отрицательные индексы химических сдвигов [14, 15] всех протонов $C^\alpha H$ спирали 6–16, в то время как для двух других спиралей наблюдается чередование положительных, отрицательных и нулевых индексов (рис. 2).

Наличие в полипептидной цепи белка участков, характеризующихся интенсивными кросс-пиками ЯЭО $C^\alpha H(i)/NH(i+1)$ при слабых или отсутствующих кросс-пиках $NH(i)/NH(i+1)$, указывает на то, что они принадлежат развернутым участкам цепи. Этот вывод подтверждается большими значениями для них КССВ ${}^3J_{NH, C^\alpha H}$ (>8 Гц,

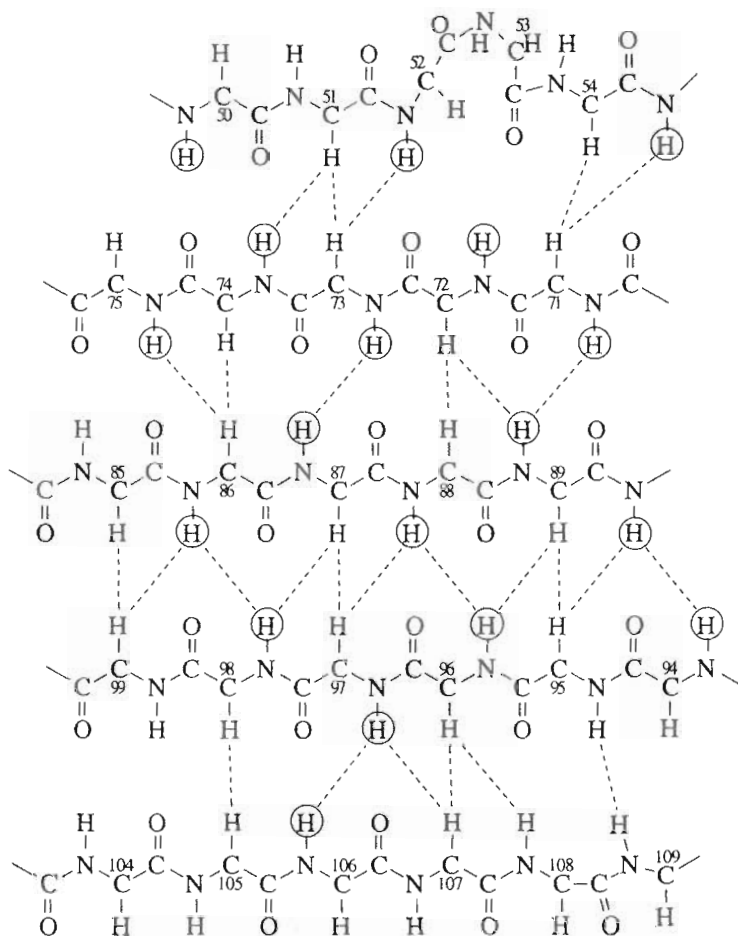


Рис. 4. Схема 5-тяжевой антипараллельной β -структуры биназы. Штриховыми линиями показаны "дальние" контакты ЯЭО. Медленно обменивающиеся с растворителем протоны NH обведены кружком.

рис. 2). Анализ спектров NOESY в H_2O и $^2\text{H}_2\text{O}$ выявил многочисленные контакты ЯЭО между протонами, расположенными в различных развернутых участках полипептидной цепи биназы (рис. 4).

Все полученные данные (d -связи, КССВ $^3J_{\text{NH}, \text{C}^\alpha\text{H}}$, скорости дейтерообмена, рис. 2) однозначно согласуются с наличием в С-концевой части биназы β -слоя, показанного на рис. 4. β -Слой состоит из пяти антипараллельных β -тяжей, включающих остатки 50–55, 71–75, 86–90, 95–99 и 104–108. Наличие водородных связей, скрепляющих тяжи β -слоя, подтверждается данными о скоростях обмена с растворителем амидных протонов основной цепи белка (рис. 2, 4). Так, все амидные протоны тяжей 71–75 и 86–89 (центральные тяжи в β -слое) обмениваются медленно, а у периферических тяжей медленно обменивающиеся амидные протоны чередуются с быстро обменивающимися. Анализ индексов химических сдвигов сигналов протонов C^αH биназы (рис. 2) подтверждает выводы, полученные при анализе d -связей, КССВ $^3J_{\text{NH}, \text{C}^\alpha\text{H}}$ и скоростей дейтерообмена протонов NH.

Все вышеперечисленные данные (рис. 2) позволяют предположить, что остатки Gly52 и Asp53 образуют β -горб (β -bulge) классического типа [16].

Кроме того, данные КССВ $^3J_{\text{NH}, \text{C}^\alpha\text{H}}$ и кросс-пиков ЯЭО свидетельствуют о присутствии в структуре биназы различных β -поворотов, что естественно при наличии β -слоя из большого числа тяжей. Определение их точной конформации, однако, станет возможным только на этапе расчета детальной пространственной структуры белка.

Сравнение вторичных структур барназы и биназы. Согласно исследованиям барназы [6, 7, 9–11] – белка, гомологичного биназе, – ее вторичная структура в основном повторяет рассматриваемую. Наряду с наличием тех же главных структурных элементов (три спирали в N-концевой части молекулы, β -слой из пяти антипараллельных β -тяжей) велико сходство и по неклассическим элементам регулярной структуры, таким, например, как β -горб в середине первого β -тяжа. Сведения о пространственной структуре барназы в растворе, приведенные в [7] и содержащиеся в структуре, донированной этими же авторами в Брукхейвен-

ский банк белковых структур (код структуры 1bng), противоречивы. Например, в статье [7] сообщается о неупорядоченной структуре на участке, соответствующем третьей спирали биназы, а из анализа 20 депонированных структур следует, что этот участок имеет α -спиральную конформацию. Наличие в спектрах NOESY биназы кросс-пиков $C^{\alpha}H(\text{Leu41})/NH(\text{Val44})$, $C^{\alpha}H(\text{Ala42})/NH(\text{Ala45})$ и слабого кросс-пика $C^{\alpha}H(\text{Leu41})/NH(\text{Ala45})$ говорит о спиральной (видимо, α -спиральной) конформации участка 41–45 биназы. Отметим, что в рентгеноструктурной модели барназы этот участок также имеет α -спиральную конформацию [17]. Положение 5-го β -тяжа барназы несколько отличается по разным данным: согласно [7], β -тяж составляют остатки 104–108 (все номера остатков соответствуют последовательности биназы), в структуре 1bng, полученной по данным ЯМР, он отсутствует (вероятнее всего, он состоит всего лишь из двух остатков: 106–107), в рентгеноструктурной модели [17] (код 1bn1 в Брукхейвском банке) 5-й β -тяж составляют остатки 106–109. Такие незначительные расхождения, скорее всего, объясняются тем, что в барназе 5-й тяж β -структуры более подвижен, чем остальные, что хорошо согласуется с нашими выводами.

В работе [18] не приведено отнесение сигналов протонов ароматического кольца тирозина барназы, соответствующего остатку Tyr89 биназы. Поэтому не исключено, что в барназе вращение ароматического кольца этого тирозина также замедленно и либо авторы не дали интерпретацию этому феномену, либо скорость вращения ароматического кольца барназы несколько выше, чем у биназы, и сигналы протонов ароматического кольца в спектрах ЯМР барназы не наблюдаются (при скоростях обмена порядка 1000 с^{-1} сигналы его протонов будут сильно уширены).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приготовление образца. Для экспрессии биназы использовали вектор pGEMEX/Bi-Nde [20], культуру *E. coli* BL-21(DE3)(pLys S). Клетки выращивали при 37°C на ТВ-среде. Культуральную жидкость подкисляли уксусной кислотой до pH 4.0, выдерживали 1 ч при перемешивании при 4°C , а затем центрифугировали 15 мин при $6000g$. Супернатант разбавляли в 5 раз водой и перемешивали на механической мешалке в течение ночи со 100 мл фосфоцеллюлозы P-11 (Whatman), предварительно уравновешенной 0.02 М Na-ацетатным буфером (pH 5.0). Сорбент переносили в колонку ($2.5 \times 10 \text{ см}$), белки элюировали 2 М ацетатом аммония (pH 8.0). Элюат диализовали против 0.02 М Na-ацетатного буфера (pH 5.0) и наносили на колонку ($1 \times 10 \text{ см}$) Mono-S (Pharmacia), уравновешенную тем же буфером. Белок элюировали градиентом ацетата натрия от 0.02 до 0.5 М при pH 5.0. Фермент выходил с колонки при концентрации

ацетата натрия около 0.24 М. Полученный элюат наносили на колонку с сефадексом G-75, уравновешенную 0.01 М К-фосфатным буфером (pH 6.7). Очищенную биназу собирали и концентрировали в ячейке "Amicon" на мембране UM-2 до концентрации 20 мг/мл. Перед съемкой спектров ЯМР в образец добавляли 10% $^2\text{H}_2\text{O}$.

Спектроскопия ЯМР. Все эксперименты ^1H -ЯМР проводились на спектрометре Unity-600 (Varian, США). ^1H -ЯМР-спектры DQF-COSY (30°C), TOCSY (время смешивания компонент намагниченности $\tau_m = 40$ и 80 мс , 30 и 45°C) и NOESY ($\tau_m = 40, 100, 200 \text{ мс}$, $10, 30$ и 45°C) биназы в H_2O (и в $^2\text{H}_2\text{O}$ для спектров NOESY) были сняты в фазоизбирательном режиме по методу [19]. Для подавления сигнала воды использовались методы FLIP-BACK [20] и WATERGATE [21]. Спектральная ширина спектров во всех экспериментах составила 10000 Гц по обоим направлениям. Время регистрации составляло 0.41 с для спектров TOCSY и NOESY и 0.82 с для DQF-COSY и одномерных спектров; задержка на релаксацию во всех спектрах составляла 1.2 с. Число комплексных точек по направлению t_1 в спектрах TOCSY, NOESY и DQF-COSY составило 320, 420 и 700 соответственно. Химические сдвиги в спектрах измерялись относительно сигнала воды, химический сдвиг которого относительно сигнала тетраметилсилана равен 4.95, 4.75, 4.6 м. д. при 10, 30 и 45°C соответственно.

Для измерения скоростей обмена амидных протонов биназы с растворителем образец был лиофилизирован из буфера и растворен в "100%-ной" $^2\text{H}_2\text{O}$ (SIC, США). Сначала было получено 7 одномерных спектров ^1H -ЯМР при 30°C (время регистрации спектра 8 мин). Они стартовали соответственно через 25, 40, 55, 70, 85, 100 и 135 мин после растворения образца в $^2\text{H}_2\text{O}$. Затем было последовательно получено 9 спектров NOESY ($\tau_m = 100 \text{ мс}$) (время регистрации спектра 8 ч) при 30°C , стартовавших соответственно через 3, 11, 19, 27, 35, 43, 51, 59 и 127 ч после растворения образца. Между экспериментами образец сохранялся при 30°C .

Для получения информации в спектральной области, находящейся вблизи сигнала воды, образец биназы после измерения скоростей дейтерообмена был повторно лиофилизирован и растворен в "100%-ной" $^2\text{H}_2\text{O}$. Спектры DQF-COSY, TOCSY ($\tau_m = 40$ и 80 мс) и NOESY ($\tau_m = 40, 100 \text{ мс}$) получены при 30°C без подавления остаточного сигнала воды.

Математическую обработку спектров ЯМР осуществляли с использованием стандартного программного обеспечения VNMR (Varian, США) на компьютерах SUN SparcStation Ultra 1 (Sun Microsystems, США). Все двумерные спектры преобразовывали с использованием цифровой фильтрации сигнала растворителя по направлению ω_2 и гауссовых весовых функций по обоим направле-

ниям. Размеры спектров после преобразования составляли 2048 × 8192 точек.

Отнесение сигналов в двумерных спектрах ЯМР проводили с помощью программы XEASY [22]. КССВ $^3J_{\text{NH}, \text{C}^{\alpha}\text{H}}$ измеряли путем анализа расщепления перекрывающихся кросс-пиков протонов NH в двумерных спектрах NOESY и TOCSY с помощью программы INFIT.

Индекс химических сдвигов рассчитан по методике [15]. Если химический сдвиг протона C^αH какого-либо остатка отличался более чем на 0.1 м. д. от табличного значения для данного остатка в неупорядоченной конформации [14], то этому остатку приписывался индекс "+" (если химический сдвиг больше табличного) или "-" (если химический сдвиг меньше табличного), а в противном случае приписывался индекс "0".

Работа выполнена на установке "Комплекс ЯМР-спектроскопии" при финансовой поддержке Государственного комитета по науке и технологиям (грант № 96-03-08) и Российского фонда фундаментальных исследований (ЦКП, грант № 96-24-4И/373). Работа выполнялась при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 96-04-50893, 96-04-49852) и ГНТП (грант № 03.0002Н-318).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Булгакова Р.Ш., Лецинская И.Б., Балабан Н.П., Егорова Г.С. // Биохимия. 1974. Т. 39. С. 299–302.
2. Нуркиянова К.М., Шульга А.А., Захарьев В.М. // Докл. АН СССР. 1989. Т. 309. С. 1476–1479.
3. Hill Ch., Dodson G., Heinemann U. // Trends Biochem. Sci. 1983. V. 8. P. 364–369.
4. Курбанов Ф.Т. Структурно-функциональное картирование молекул барназы и биназы методом гибридных генов. Автореф. ... канд. биол. наук. М.: ИБХ РАН, 1996.
5. Schreiber G., Fersht A.R. // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 5145–5150.
6. Hartley R.W. // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 5978–5984.
7. Bycroft M., Ludvigsen S., Fersht A.R., Poulsen F.M. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 8697–8701.
8. Yakovlev G.I., Moiseev G.P., Protasevich I.I., Ranjbar B., Bocharov A.L., Kirpichnikov M.P., Gilli R.M., Briand C.M., Hartley R.W., Makarov A.A. // FEBS Lett. 1995. V. 366. P. 156–158.
9. Lubienski M.J., Bycroft M., Freund S.M.V., Fersht A.R. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 8866–8877.
10. Jones D.N.M., Bycroft M., Lubienski M.J., Fersht A.R. // FEBS Lett. 1993. V. 331. P. 165–172.
11. Buckle A.M., Schreiber G., Fersht A.R. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 8878–8889.
12. Wuthrich K. NMR of Proteins and Nucleic Acids. N.Y.: Wiley, 1986.
13. Курочкин А.В., Кирпичников М.П., Рутерьянц Х. // Докл. АН СССР. 1991. Т. 321. С. 1282–1287.
14. Wishart D.S., Sykes B.D., Richards F.M. // J. Mol. Biol. 1992. V. 222. P. 311–333.
15. Wishart D.S., Sykes B.D., Richards F.M. // J. Mol. Biol. 1992. V. 31. P. 1647–1651.
16. Richardson J.S. // Adv. Protein Chem. 1981. V. 34. P. 167–339.
17. Maugen Y., Hartley R.W., Dodson E.J., Dodson G.G., Bricogne G., Chothia C., Jack A. // Nature. 1982. V. 297. P. 162–164.
18. Bycroft M., Sheppard R.N., Lau F.T.-K., Fersht A.R. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 7425–7432.
19. States D.J., Habercorn R.A., Ruben D.J. // J. Magn. Reson. 1982. V. 48. P. 286–292.
20. Lippens G., Dhalluin C., Wieruszkeski J.-M. // J. Biomol. NMR. 1995. V. 5. P. 327–332.
21. Kay L.E. // Prog. Biophys. Molec. Biol. 1995. V. 63. P. 277–299.
22. Bartels C., Xia T.-H., Billeter M., Güntert P., Wuthrich K. // J. Biomol. NMR. 1995. V. 5. P. 1–10.

The Secondary Structure of Binase in Solution Determined by ^1H NMR

M. Ya. Reibarkh*, D. E. Nolde*, E. V. Bocharov*, L. I. Vasil'eva*,
A. A. Shulga**, M. P. Kirpichnikov*, and A. S. Arseniev*

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

**Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, GSP-1 Moscow, 117984 Russia

Abstract—Nearly all resonances were assigned in the two-dimensional ^1H NMR spectra of binase, guanyl-specific ribonuclease from *Bacillus intermedius* containing 109 amino acid residues. The exchange rates of amide protons with the solvent deuterium were measured in $^2\text{H}_2\text{O}$ at pH 6.7 and 30°C. Coupling constants 3J of H-NC^α-H, NOE contacts, solvent exchange rates of amide protons, and indices of C^αH chemical shifts were measured, and the binase secondary structure was deduced from these data. It involves three α-helices in the N-terminal part (the 6–16, 26–31, and 41–45 segments) and a β-sheet formed by five antiparallel β-strands (51–55, 71–75, 86–90, 95–99, and 104–108 segments). The binase secondary structure was compared with that of its closest homologue, barnase from *B. amyloliquefaciens*.

Key words: proteins, ribonucleases, secondary structure, NMR.