

**ESTUDIS CONFORMACIONALS
DE LES PARVALBÚMINES MUSCULARS
ANALISI PER RESSONANCIA MAGNÈTICA NUCLEAR**

per JOSEP PARELLÓ *, ADRIEN CAVE *,
PERE PUIGDOMÈNECH **, JEAN-PAUL CAPONY
i JEAN-FRANÇOIS PÉCHÈRE

Département de Biochimie Macromoléculaire
du CNRS (Montpellier)

Les parvalbúmines musculars, proteïnes presents en els vertebrats inferiors, han estat estudiades tant per raigs X com per d'altres mètodes espectroscòpics. Aquests estudis han demostrat el caràcter globular d'aquestes proteïnes, el seu alt grau d'ordre (40 % d'helicitat) i una alta proporció de residus Phe en el seu interior. Recentment ha estat descobert que les parvalbúmines lliguen fortament dos ions Ca^{++} per molècula, situació que permet una possible analogia funcional d'aquestes proteïnes amb la troponina C, proteïna reguladora present en els músculs dels vertebrats superiors. L'aplicació de l'espectroscòpia RMN ha de servir per a la identificació dels canvis conformacionals associats amb els processos de captació i cessió dels ions de calci en aquestes proteïnes, la qual cosa permet una aproximació als canvis moleculars associats amb la seva funció.

En el present treball exposem els resultats d'experiments preliminars amb RMN, de protó a 100 i 270 MHz, sobre dues parvalbúmines (de carpa i lluç), amb el propòsit de visualitzar els canvis conformacionals associats amb la presència d'un agent químic desnaturalitzant, el clorur de guanidina, i amb l'eliminació progressiva dels ions de calci fortament lligats. D'altra banda, ha estat investigada la possibilitat d'utilit-

* Adreça actual: *Équipe de Biophysique, CNRS, Faculté des Sciences 34060 - Montpellier.*

** Adreça permanent: Institut de Biologia Fonamental. Nova Universitat Autònoma de Barcelona. Avda. Sant Antoni M. Claret, núm. 171 - Barcelona-13.

zar la RMN com una tècnica, juntament amb la determinació de l'estructura primària de la proteïna, per a establir la presència de grups acetils N-terminal.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Espectre de la proteïna desnaturalitzada. — L'espectre de la proteïna desnaturalitzada amb clorur de guanidina presenta diverses característiques interessants: en primer lloc la presència d'un senyal atribuït al grup acetil N-terminal. La seva presència ha estat confirmada posteriorment per mètodes químics.

Seguint el mètode de McDONALD i PHILLIPS, hom ha simulat l'espectre de la proteïna desnaturalitzada. En comparació amb l'espectre experimental, és observat un desplaçament general dels pics. La correcció d'aquest efecte pot ésser feta tenint en compte que és pres com a referència interna el senyal metil del DSS i que la presència de clorur de guanidina afecta el desplaçament químic.

Una altra discrepància és observada vers la zona de 2,75 ppm que hem d'atribuir als residus Asp. Aquesta diferència és deguda segurament al valor excessivament alt donat a l'amplada a mitja alçada del grup $-CH_2$ del residu Asp. Les parvalbúmines contenen un elevat nombre de residus Asp (10/108 i 14/108 en les corresponents a lluç i carpa respectivament). L'estudi per RMN d'una gran varietat de parvalbúmines podrà permetre d'obtenir un millor valor per a aquesta amplada.

Espectre de la proteïna nativa. — L'aspecte general de l'espectre de la proteïna nativa és bastant diferent del prèviament discutit. Hi són observats un gran nombre de senyals discrets, els quals resulten de l'efecte de les diferents i específiques interaccions moleculars en les estructures natives sobre els desplaçaments químics de cada grup de protons equivalents.

A causa de l'alt contingut en Phe (10/108 residus) per a les parvalbúmines de lluç i carpa, pot ésser predit que les interaccions hidrofòbiques entre residus aromàtics i alifàtics, especialment grups metils, han d'ésser particularment fortes i determinants de la cohesió global de la molècula. Aquest cas és de les parvalbúmines de carpa, com ha estat demostrat per raigs X: 18 residus alifàtics no polars (7 Leu, 4 Ile, 3 Val i 4 Ala) són interns, i hom els troba en un embolcall aromàtic de 8 residus Phe interns. L'explicació dels desplaçaments observats en les proteïnes natives respecte a les desnaturalitzades pot ésser intentada sobre la base de la pertorbació magnètica deguda al caràcter aromàtic dels residus Phe, sobretot en les regions de l'espectre situades en camp fort.

La magnitud de l'efecte degut a un anell benzènic ha estat predita

semiquantitativament per JOHNSON i BOVEY fent servir el concepte de l'espira de corrent. El model de J. i B. ha estat aplicat satisfactòriament per predir tant els efectes inter- o intramoleculars com els deguts al solvent.

El model de J. i B. fou aplicat a la parvalbúmina de carpa utilitzant les coordenades conegudes per raigs X. L'aproximació dels residus aromàtics de la fenilalanina per un anell benzènic sembla justificada en una proteïna en què d'altres tipus de residus aromàtics no compten. Els efectes d'aquests residus són molt més importants que d'altres efectes de seqüència. Això justifica de prendre només aquests per a predir l'espectre.

L'espectre de la proteïna nativa així calculat fou comparat amb el registrat experimentalment. La concordança entre els espectres calculat i experimental és bastant satisfactòria per a desplaçaments lleugers. No hi ha concordança aparent per als grans desplaçaments, però el nombre de senyals molt desplaçats és el mateix. En particular el senyal situat més lluny és el metil de la Val 106, teòricament situat a -1.03 ppm, que en l'espectre experimental figura a -0.35 ppm.

Dues explicacions possibles poden ésser donades per a aquestes discrepàncies: 1) L'estructura en solució és diferent de la que té en el cristall. Una simple separació de dues hèlixs, possible en una estructura més disgregada, com és ara la que hom troba en solució, pot donar lloc a canvis sensibles. 2) En dissolució, l'equilibri entre rotàmers de les cadenes laterals de la valina pot estar alterat, igualment que la seva cinètica.

El model de J. i B. fa aparents dos tipus d'interaccions entre residus aromàtics i alifàtics: 1) Interaccions entre residus pròxims. En particular, interaccions entre un residu aromàtic trobat en posició d'una hèlix α i un alifàtic situat en posicions $n \pm (4 \text{ o } 5)$ en la mateixa hèlix, alterança típica en les hèlix α . 2) Interaccions entre residus llunyans en la seqüència. Són especialment interessants les que hom efectua entre residus de segments d'hèlixs diferents. Aquestes interaccions podrien tenir un paper important en el manteniment de l'estructura terciària. En la parvalbúmina estudiada, són observades tres intenses interaccions d'aquesta classe, una de les quals, la Val 106-Phe 30, podria jugar un paper important en la funció de la molècula, com a variadora de la posició del fragment d'hèlix F, adjacent a la regió EF, que és un dels dos punts d'unió del calci.