

**ДОКЛАДЫ**  
**АКАДЕМИИ НАУК СССР**

**1980**

**ТОМ 250 № 3**

(ОТДЕЛЬНЫЙ ОТТИСК)

Ю.Н. ЧИРГАДЗЕ, Ю.В. СЕРГЕЕВ, Н.П. ФОМЕНКОВА, С.В. НИКОНОВ, В.Ю. ЛУНИН

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ  $\gamma$ -КРИСТАЛЛИНА II  
ИЗ ГЛАЗНОЙ ЛИНЗЫ ТЕЛЕНКА С РАЗРЕШЕНИЕМ 5 Å**

(Представлено академиком А.С. Спириным 25 XII 1979)

Кристаллины – водорастворимые структурные белки глазной линзы позвоночных. Обычно эти белки разделяют на три основные группы  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ <sup>(1)</sup>. По молекулярной массе эти белки можно разделить на пять групп  $\alpha$ НМ,  $\alpha$ ,  $\beta$ Н,  $\beta$ L и  $\gamma$  с массой соответственно около 3 млн, 580, 160, 46 и 21 тыс. дальтон<sup>(2)</sup>. Было показано, что несмотря на столь различную массу и аминокислотный состав все белки имеют сходную вторичную структуру: по данным кругового дихроизма в ультрафиолетовой области упорядоченная структура полипептидной цепи находится в них преимущественно в форме складчатого слоя<sup>(2)</sup>. Предполагают, что все кристаллины состоят из одинаковых субъединиц с молекулярной массой около 20 тыс. дальтон, а субъединицы имеют третичную структуру близкую к таковой для  $\gamma$ -кристаллина<sup>(2)</sup>. Белки этой последней группы в свою очередь могут быть разделены на ряд фракций, близких по аминокислотным последовательностям и молекулярной массе<sup>(3)</sup>. Все  $\gamma$ -кристаллины, и в особенности  $\gamma$ -кристаллины фракции II, характеризуются большим содержанием SH-групп, играющих важную роль в процессе поддержания нормального состояния глазной линзы<sup>(4)</sup>. С возрастом или при катаракте (помутнении хрусталика) количество SH-групп уменьшается, одновременно возрастает число S–S связей<sup>(5)</sup>. Недавно для  $\gamma$ -кристаллинов фракций II, IIIб и IV были выращены монокристаллы<sup>(6, 7)</sup> и проведены предварительные кристаллографические исследования<sup>(7, 8)</sup>.

В данной работе представлены результаты рентгеноструктурного анализа кристаллов  $\gamma$ -кристаллина фракции II, полученного из водорастворимой части глазной линзы телят трехмесячного возраста. Процедура выделения, очистки, кристаллизации белка и выращивания больших монокристаллов описана в работах<sup>(6, 7)</sup>. Кристаллы относятся к пространственной группе P4<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2 (или P4<sub>3</sub>2<sub>1</sub>2) с размерами элементарной ячейки  $a = b = 58,0 \text{ \AA}$  и  $c = 98,6 \text{ \AA}$ . В ячейке находится 8 молекул белка. Асимметричная часть ячейки содержит 1 молекулу с массой  $\sim 20000$  дальтон. Маточный раствор, в котором находились выращенные кристаллы белка, содержал 0,002 M дитиотреитол, pH около 7; 0,05 M K–Na-фосфатный или трис-ацетатный буфер.

Определение структуры было проведено методом изоморфных замещений. При поиске изоморфных производных опробовано около 40 различных соединений. Производные отбирали по паттерсонским центросимметричным проекциям. Трехмерные наборы дифракционных данных были получены прецессионным фотометодом. В зоне 18–5 Å в каждом наборе измерено от 410 до 560 отражений со средним значением фактора расходимости  $R_{\text{сим}} = 5\text{--}7\%$ . Фазы определяли только для отражений, структурная амплитуда которых была отлична от нуля для всех производных. Число таких отражений составило 277. Подходящими оказались только пять производных, указанных в табл. 1. Часть производных получена для обычных кристаллов белка, другие – для кристаллов, сшитых глутаровым альдегидом (концентрация около 3%, время около 15 ч). Параметры решетки и интенсивности отражений сшитого и несшитого кристалла практически не менялись. Кристаллографическая задача определения фаз решалась только для группы P4<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2. Фактор достоверности определения фаз  $m = 0,86$ , ряд других факторов<sup>(9)</sup> приведен в табл. Основные места тяжелых атомов находили по харьковским сечениям. Решение

Таблица 1

Фазовая статистика и параметры тяжелых атомов кристалла  $\gamma$ -кристаллина II при разрешении 5 Å

Соединение, условия введения	Фазовая статистика				Параметры тяжелых атомов					
	$R_F$	$R_K$	$R_C$	$f/E$	Место	$x/a$	$y/b$	$z/c$	$K$	$B$
$\text{Na}_2\text{WO}_4$ , 5 mM, 5 суток	15,1	11,4	69,0	0,94	—	911	857	496	0,73	126
$\text{KAu}(\text{CN})_2$ , 1 mM, 5 суток	15,6	10,1	63,3	1,05	A	325	888	408	0,43	6
$\text{KAu}(\text{CN})_2^*$ , 5 mM, 3 суток	32,8	14,6	45,2	2,18	A	336	872	402	0,95	45
					B	613	392	463	1,08	33
					C	980	219	485	0,50	34
					—	351	168	409	0,32	32
$\text{CH}_3\text{HgOOCCH}_3^*$ , 5 mM, 18 ч	32,3	15,7	45,7	2,20	A	332	895	411	0,60	25
					B	587	400	470	0,85	25
					C	995	249	500	0,89	35
					—	052	353	434	0,81	22
$\text{K}_3\text{IrBr}_6^*$ , 10 mM, 7 суток	20,1	13,7	65,2	1,13	—	754	964	483	0,27	107
					—	012	572	372	0,19	60
					A	398	957	403	0,13	120
					—	853	801	473	0,13	80
					—	263	213	448	0,07	36

П р и м е ч а н и я. 1) Звездочкой отмечены кристаллы, сшитые глутаровым альдегидом. 2) Все факторы  $R$  приведены в %. Факторы Краута  $R_K$ , Кулис  $R_C$ , среднеквадратичная ошибка изоморфизма  $E$  определены, как в работе (9),  $f$  — рассчитанная среднеквадратичная структурная амплитуда тяжелых атомов. 3)  $R_F = 2|F_p - F_{pH}|/|F_p + F_{pH}|$ , здесь  $F_p$  и  $F_{pH}$  — модули структурных амплитуд нативного белка и производной. 4) Координаты тяжелых атомов  $x, y, z$  приведены в долях ребер элементарной ячейки,  $K$  — относительный коэффициент заполнения места присоединения тяжелого атома,  $B$  — температурный фактор тяжелого атома  $\text{Å}^2$ .

паттерсоновских синтезов для многоместных производных осуществляли с помощью перекрестных разностных и двойных разностных синтезов Фурье. Для этих целей использовали фазовую программу и комплекс программ быстрого фурье-преобразования, которые любезно передал нам доктор Л. Тен Эйк (10). Оба эти комплекса программ были поставлены в Научно-исследовательском вычислительном центре АН СССР на ЭВМ ЕС 1040 (11).

Анализ распределения электронной плотности позволил выделить вдоль оси с элементарной ячейки четыре слоя молекул. Молекулы соседних слоев ориентированы в перпендикулярных направлениях. Внутри слоя молекулы вытянуты приблизительно вдоль оси  $a$  (или вдоль оси  $b$  в соседнем слое). Молекула  $\gamma$ -кристаллина II имеет общие размеры  $56 \times 29 \times 25 \text{ Å}$  (рис. 1). Она состоит из двух отдельных глобул, каждая из которых может быть представлена в виде цилиндра диаметром около  $29 \text{ Å}$  и высотой около  $25 \text{ Å}$ . Глобулы тесно примыкают одна к другой, но связаны между собой только одной перетяжкой. Внутри слоя глобулярные части разных молекул имеют явно выраженные точки контактов. Структура молекулы этого белка при несколько более низком разрешении  $5,5 \text{ Å}$  была недавно представлена английскими исследователями (12). Структура решалась на четырех производных с использованием для трех из них данных по аномальному рассеянию. Использованные производные отличаются от наших, за исключением одной — цианоаураната калия. Имеется отличие и в наборе мест посадки тяжелых атомов, хотя три общих основных места A, B, C присутствуют. Представленная нами модель молекулы более детальна и, по-видимому, вернее описывает формулу молекулы вслед-

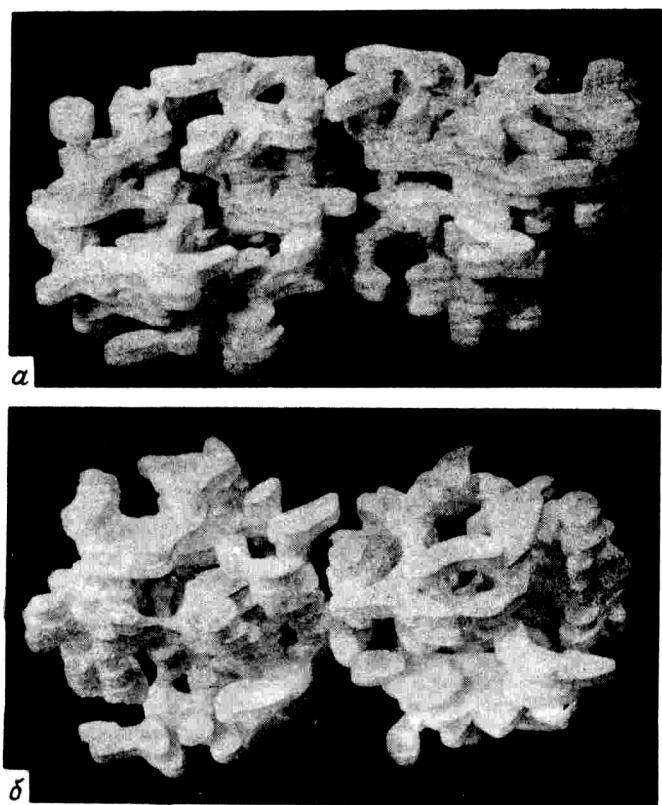


Рис. 1. Фотография модели молекулы  $\gamma$ -кристаллина фракции II из глазной линзы теленка при разрешении 5 Å. а – вид "спереди", б – вид "сзади"

ствие более высокого разрешения. Этим и объясняется некоторое различие в общих размерах: размеры молекулы, указанные авторами работы (<sup>1,2</sup>), равны 55 × 30 × 25 Å.

Авторы выражают признательность профессору Б.В. Мэтьюзу (B.W. Matthews) и доктору Л.Ф. Тен Эйку (L.F. Ten Eyck) из Института молекулярной биологии Орегонского университета, США, за представление программ по обработке рентгеновских данных, уточнению фаз, быстрому преобразованию Фурье и полезное обсуждение многих вопросов. Авторы благодарят проф. Н.С. Андрееву и А.А. Федорова из Института молекулярной биологии АН СССР, В.Р. Мелик-Адамяна из Института кристаллографии АН СССР за весьма полезные обсуждения методики исследования на разных этапах. Авторы благодарят директора Научно-исследовательского вычислительного центра АН СССР проф. А.М. Молчанова, а также Э.Э. Шноля, Л.В. Луневскую, Н.Л. Лунину и А.Г. Уржумцева за большую помощь в постановке программ и проведении вычислений. Авторы благодарят многих сотрудников Института белка АН СССР, оказавших помощь при выполнении данной работы, и в особенности зав. группы препаративной биохимии М.Б. Гарбер, Л.С. Решетниковой, И.В. Савченко за выделение высокоочищенного препарата белка и выращивание монокристаллов, зав. группой органического синтеза К.Х. Зихермана за синтез ряда соединений, использованных для получения изоморфных производных, сотрудников лаборатории структурного анализа белка Н.А. Лежневу, В.К. Есипова, В.П. Маркина и В.Д. Орешина за большое повседневное участие в проведении экспериментальной части работы.

Авторы хотели бы выразить особую признательность акад. А.С. Спирину и проф. О.Б. Птицыну за активную поддержку данной работы, итогом которой явилось создание и объединение ряда научных коллективов, способных решать сложные задачи определения пространственной структуры белков.

Институт белка Академии наук СССР,  
Научно-исследовательский вычислительный центр Академии наук СССР,  
Пущино Московской обл.

Поступило  
26 XII 1979

#### ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> I. Bjork, Exp. Eye Res., v. 1, 145 (1961). <sup>2</sup> S.H. Chiou, P. Azari et al., Intern. J. Peptide Res., v. 13, 409 (1979). <sup>3</sup> I. Bjork, Exp. Eye Res., v. 3, 254 (1964). <sup>4</sup> L.R. Croft, Biochem. J., v. 128, 961 (1972). <sup>5</sup> E.J. East, R.C.C. Chang et al., J. Biol. Chem., v. 253, 1436 (1978). <sup>6</sup> М.Б. Гарбер, Л.С. Решетникова, ДАН, т. 226, 1452 (1976). <sup>7</sup> Yu.N. Chirgadze, S.V. Nikonorov et al., J. Mol. Biol., v. 110, 619 (1977). <sup>8</sup> C.H. Carlisle, P.F. Lindley et al., J. Mol. Biol., v. 110, 417 (1977). <sup>9</sup> R.E. Dickerson, J.E. Weinzierl, R.A. Palmer, Acta crystallogr., v. B24, 997 (1968). <sup>10</sup> L.F. Ten Eyck, ibid., v. A29, 183 (1973). <sup>11</sup> В.Ю. Лунин, Комплекс программ: Быстрое преобразование Фурье, Фазовая программа Тен Эйка, Пущино, 1979. <sup>12</sup> T.L. Blundell, P.F. Lindley et al., Acta crystallogr., v. B34, 3653 (1978).