



УДК 577.322.6

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА
ЛЕЙЦИН-СПЕЦИФИЧНОГО БЕЛКА ПРИ РАЗРЕШЕНИИ 4 Å

Цыганник И. Н., Нуднов В. Ю., Траханов С. Д.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Лейцин-специфичный белок (L-белок, M_r 37 000), участвующий в системе высокоаффинного транспорта L-лейцина в периплазматическом пространстве *Escherichia coli*, закристаллизован в форме, подходящей для рентгеноструктурных исследований. На основе дифракционных данных, полученных для кристаллов нативного белка и пяти его изоморфных производных, определена пространственная структура L-белка с разрешением 4 Å. Молекула белка имеет форму вытянутого эллипсоида с приблизительными размерами по осям $40 \times 40 \times 75$ Å. Она состоит из двух структурно подобных доменов, соединенных перешейком, и небольшого участка неупорядоченной полипептидной цепи, расположенного над междоменным пространством. Каждый из доменов образован β -листом, окруженным несколькими α -спиралями. Центр связывания L-лейцина молекулой L-белка локализован, по-видимому, в глубине узкой полости в области междоменного перешейка. Отмечено структурное сходство L-белка и некоторых других связывающих белков *E. coli*.

Лейцин-специфичный белок (L-белок, M_r 37 000), выделенный из *Escherichia coli* [1], является представителем целого ряда белков, присутствующих в периплазматическом пространстве грамотрицательных микроорганизмов и связывающих аминокислоты, моносахариды, гликозиды, витамины и некоторые ионы. Интересные биологические свойства этих белков послужили причиной развертывания широких исследований их структуры и функции. L-Белок участвует в системе транспорта L-лейцина в периплазматическом пространстве *E. coli* и обладает высоким сродством к субстрату ($K_d \sim 10^{-7}$ M) [2, 3]. По своей первичной структуре и функциональному поведению он сходен с лейцин-изолейцин-валинсвязывающим белком из *E. coli* [4, 5], что позволяет предположить сходство и их пространственных структур. В последние годы монокристаллы ряда связывающих белков получены в форме, пригодной для рентгеноструктурных исследований [5–7], а для D-Gal- и L-Ara-связывающих белков из *E. coli* установлены трехмерные структуры молекул с разрешением соответственно 4,1 и 2,4 Å [8, 9]. Для L-белка также были получены монокристаллы [10] и установлена трехмерная структура его молекулы при разрешении 5 Å [11]. Настоящее сообщение посвящено описанию пространственной структуры L-белка при разрешении 4 Å.

Карта электронной плотности L-белка при разрешении 4 Å была рассчитана на 84 сечениях через 0,88 Å вдоль оси z с использованием центроидных фаз [12], вычисленных по пяти тяжелоатомным изоморфным производным. Выбранный минимальный уровень контура на карте составлял $0,104 \text{ e}/\text{Å}^3$.

Анализ карты электронной плотности при разрешении 4 Å подтвердил правильность результатов исследований, проведенных ранее при более низком разрешении [11], и позволил выявить основные элементы вторичной и супервторичной структуры L-белка. Молекула имеет форму вытянутого эллипсоида с протяженностью по осям приблизительно $40 \times 40 \times 75$ Å. Она состоит из двух близких по размерам и подобных в структурном отношении доменов А и Б и относительно небольшого участка неупорядоченной полипептидной цепи, расположенного над междоменным перешейком (рис. 1).

Каждый из доменов состоит из уплощенного, по-видимому параллельного, β -складчатого слоя, образованного пятью-шестью β -сегментами, ко-

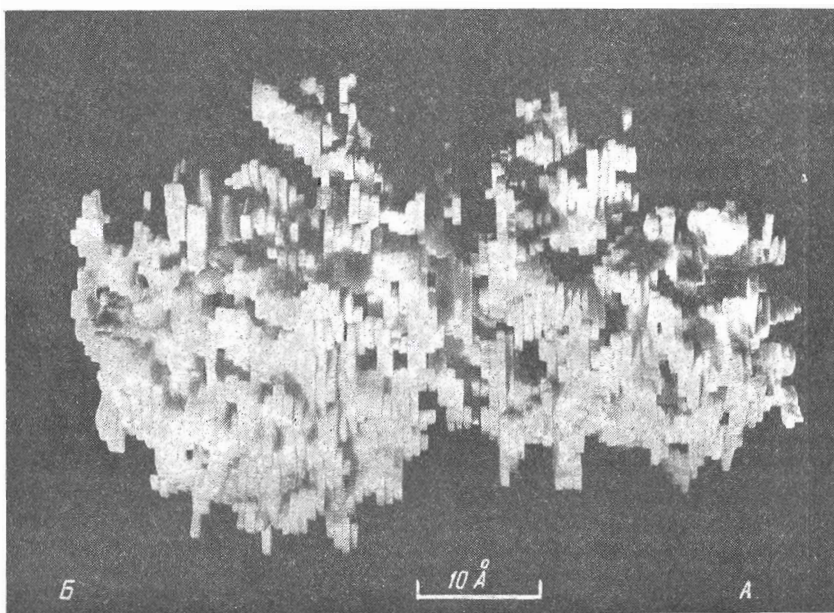


Рис. 1. Выполненная из пенопласта в масштабе 1 см/Å модель молекулы L-белка при разрешении 4 Å. Буквами А и Б обозначены домены, шариками — основные места посадки тяжелых ионов в изоморфных производных. В модели представлена электронная плотность, большая или равная $0,104 \text{ e}/\text{Å}^3$

торый окружен четырьмя α -спиралями по три-четыре витка каждая. Полипептидная цепь пересекает междоменное пространство три-четыре раза, формируя соединяющий домены перешеек. Домен Б (рис. 1) по размерам и общей длине уложенной в нем полипептидной цепи несколько больше домена А. Домены расположены так, что образуют узкую полость в области междоменного перешейка. Качество синтеза электронной плотности при разрешении 4 Å не позволило однозначно проследить ход всей полипептидной цепи в молекуле из-за имеющихся на карте разрывов и неразделяющихся пересечений цепи. Один из возможных вариантов укладки полипептидной цепи в молекуле L-белка представлен на рис. 2. Максимальная электронная плотность ($1,036 \text{ e}/\text{Å}^3$) расположена на образуемой поверхностью домена А «стенке» идеальной полости между доменами и может соответствовать внутримолекулярной дисульфидной связи (рис. 2). Два сегмента полипептидной цепи в петле, расположенной над доменом Б, обладают повышенной электронной плотностью, но однозначно идентифицировать эти участки как α -спиральные не удалось.

В работе был исследован также комплекс L-белка с аминокислотой в кристаллическом состоянии. Так как использованный для кристаллизации белок не содержал связанного субстрата [10], имелась возможность локализовать активный связывающий центр после введения субстрата в полученные кристаллы L-белка. Результаты измерения радиоактивности кристаллов, вымоченных в растворе, содержащем смесь L-[^3H]лейцина и L-[^{14}C]изолейцина (см. «Экспер. часть»), указывают на специфическое связывание L-лейцина L-белком в кристаллическом состоянии. Разностный синтез Фурье дифракционных данных нативных кристаллов и кристаллов, выдержанных в растворе L-лейцина, выявил электронную плотность, вдвое превышающую уровень фона, в глубине междоменной полости. Эта дополнительная электронная плотность может соответствовать связанной аминокислоте, тем более что наличие здесь же одного из основных мест посадки тяжелых ионов в изоморфных производных L-белка свидетельствует о доступности внутренних областей междоменной полости для объемных группировок. Приведенные данные позволяют считать, что центр специфического связывания субстрата локализован, как и в слу-

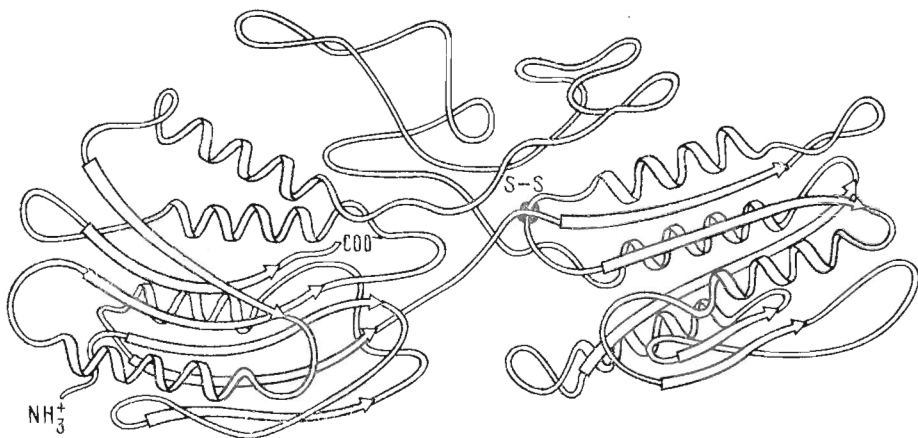


Рис. 2. Один из возможных вариантов хода полипептидной цепи в молекуле L-белка. Молекула изображена в той же ориентации, что и на рис. 1. Скрученные ленты обозначают α -спирали, стрелки — β -структурные участки

чае L-Ага-связывающего белка из *E. coli* [9], в глубине щелеобразной полости между доменами молекулы L-белка.

Таким образом, полученные результаты подтверждают сделанное в работе [13] предположение о необходимости существования у связывающих белков двухдоменной структуры и указывают на возможность общности типов укладки полипептидной цепи в доменах этих белков [14] и механизма их функционирования.

Экспериментальная часть

Лейцин-специфичный белок выделяли по методике, описанной в работе [15]. Кристаллы белка, выращенные диализом против раствора 2-метил-2,4-пентандиола, относятся к пространственной группе $P2_12_12_1$ с параметрами элементарной кристаллической ячейки a 68,8, b 69,4, c 74,2 Å. На асимметричную часть ячейки приходится одна молекула белка [10].

Для расчета фаз структурных факторов L-белка использовались те же изоморфные кристаллические производные, что и при установлении структуры с разрешением 5 Å [11]. Условия их получения и контрастность экспериментальных наборов по отношению к нативному белку, оцениваемая фактором R_D , приведены в табл. 1. Так как для $K_2Pt(NO_3)_3Br$ производного не удалось получить экспериментального набора отражений в слое разрешения 5–4 Å даже при более мягких, чем для 5 Å-набора, условиях вымачивания, эти кристаллы были использованы для измерения данных по аномальному рассеянию в сфере разрешения 5 Å.

Сбор экспериментальных данных проводился ω -методом на четырехкружном дифрактометре P1 (Syntex). Число рефлексов с $I > 3\sigma(I)$ и $I > 10\sigma(I)$, измеренных для производных L-белка в слое разрешения 5–4 Å, в среднем составляло соответственно 72 и 51% и было не ниже 68 и 46% от общего числа. Падение интенсивности трех контрольных отражений в конце съемки составляло в среднем 14% и не превышало 17%. Обработка измеренных отражений (1762 в сфере разрешения 5 Å и 3234 в сфере разрешения 4 Å) включала в себя коррекцию на L_p -фактор и поглощение [16], а также поправку на падение интенсивности вследствие радиационного разрушения кристаллов.

Уточнение параметров тяжелых атомов осуществлялось методом наименьших квадратов попеременно с этапами перевычисления фаз структурных амплитуд [17–19] по 3172 рефлексам в зоне разрешения $20 \text{ Å} > d \geq 4 \text{ Å}$ с использованием структурных факторов F , по величине больших 0,5. Уточнение проводилось в приближении анизотропного теплового движения атомов. В качестве стартового набора для процедуры уточнения были взяты параметры тяжелых атомов, полученные при разрешении 5 Å

Таблица 1

Условия получения тяжелоатомных изоморфных производных
L-белка диализным методом

Реагент	Концентрация в противорастворе в долях насыщения	Время вымачивания, сут	R_D	Разрешение, Å
$K_2Pt(NO_3)_3Br$	1/6	20	0,21	5
$K_2Pt(NO_3)_3Br^*$	1/6	15	0,15	5
K_2PtCl_6	1/6	21	0,13	4
$Pt(NH_3)_2Cl_2$	1/4	10	0,18	4
$K_2Pt(NO_3)_4$	1/10	21	0,20	4
$Pt(CH_2)_2(NH_2)_2Cl_2$	1/10	42	0,17	4

Примечание. $R_D = \Sigma |F_{BT} - F_B| / \Sigma F_B$, где F_B и F_{BT} — модули структурных факторов белка и его тяжелоатомного производного; * — съемка с фриделевскими парами отражений.

Таблица 2

Уточненные параметры тяжелых атомов в изоморфных производных L-белка

Реагент	x/a	x/a^*	y/b	y/b^*	z/c	z/c^*	g
$K_2Pt(NO_3)_3Br$	0,400	0,405	0,627	0,625	0,743	0,744	0,367
	0,414	0,486	0,693	0,705	0,884	0,885	0,287
	0,480	0,473	0,522	0,526	0,552	0,555	0,184
	0,439		0,549		0,575		0,034
	0,407		0,734		0,788		0,032
	0,637		0,759		0,703		0,029
	0,647		0,795		0,787		0,027
$K_2Pt(NO_3)_3Br^{**}$	0,413		0,693		0,885		0,190
	0,406		0,625		0,753		0,131
	0,484		0,524		0,549		0,095
	0,448		0,546		0,578		0,072
	0,434		0,532		0,538		0,065
	0,378		0,635		0,769		0,051
	0,748		0,851		0,526		0,026
0,596		0,975		0,697		0,021	
K_2PtCl_6	0,411	0,409	0,696	0,699	0,882	0,882	0,301
	0,401	0,404	0,629	0,622	0,747	0,747	0,112
	0,474	0,459	0,529	0,538	0,549	0,551	0,080
	0,433		0,575		0,580		0,044
	0,302		0,852		0,038		0,015
	0,738		0,610		0,954		0,014
	0,647		0,795		0,787		0,012
$Pt(NH_3)_2Cl_2$	0,415	0,417	0,697	0,696	0,880	0,880	0,600
	0,473		0,540	0,548	0,548		0,339
	0,432	0,457	0,564		0,570	0,565	0,282
	0,387		0,644		0,748		0,194
$K_2Pt(NO_3)_4$	0,400	0,397	0,629	0,628	0,746	0,746	-0,366
	0,412	0,409	0,693	0,695	0,883	0,815	0,329
	0,478	0,466	0,525	0,535	0,554	0,554	0,149
	0,446		0,574		0,597		0,037
	0,594		0,955		0,556		0,032
	0,665		0,770		0,697		0,030
	0,726		0,606		0,533		0,023
	0,547		0,916		0,838		0,022
$Pt(CH_2)_2(NH_2)_2Cl_2$	0,431		0,582		0,582		0,460
	0,383		0,627		0,746		0,247
	0,415		0,695		0,877		0,200
	0,442		0,543		0,552		0,130
	0,481		0,601		0,541		0,084
	0,535		0,631		0,089		0,049
	0,223		0,863		0,614		0,037
0,399		0,059		0,213		0,036	

Примечание. * — координаты, полученные «прямыми» рентгеновскими методами; g — коэффициенты заполнения в абсолютной шкале; ** — съемка с фриделевскими парами.

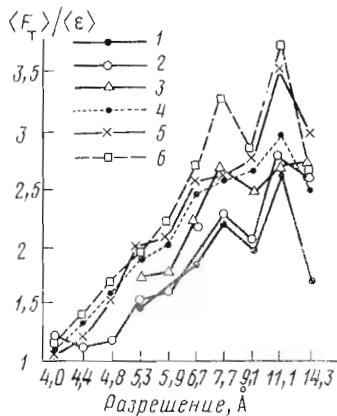


Рис. 3. Значения отношения вклада тяжелого атома $\langle F_T \rangle$ в структурный фактор производного $\langle F_{BT} \rangle$ к ошибке замкнутости фазового треугольника $\langle \epsilon \rangle$ в зависимости от разрешения (Δ) для производных, полученных с реагентами $K_2Pt(NO_3)_3Br^*$ (1), $Pt(CH_2)_2(NH_2)_2Cl_2$ (2), $K_2Pt(NO_3)_3Br$ (3), K_2PtCl_6 (4), $Pt(NH_3)_2Cl_2$ (5), $K_2Pt(NO_3)_4$ (6). * — съемка с аномальными парами отражений

[11]. Дважды проводившееся на различных этапах уточнения построение разностных синтезов Фурье не выявило дополнительных мест посадки тяжелых атомов в производных L-белка со сколько-нибудь значительными коэффициентами заполнения как по сравнению с результатами прямых рентгеновских методов [20], так и по сравнению с данными фазового уточнения при разрешении 5 Å. Как видно из табл. 2, координаты тяжелых атомов, полученные прямыми методами, лишь в двух случаях отличаются от уточненных на 0,07 доли соответствующего ребра кристаллической ячейки (~ 5 Å), среднеквадратичное же отклонение составляет 0,03 (~ 2 Å).

Как видно из табл. 3, отношение $\Delta F_T / \Delta \epsilon$ для всех производных больше единицы, что свидетельствует о возможности использования этих производных для расчета фаз в выбранной области разрешения. Значения статистических факторов R_K и $R_{ст}$ не превышают для большинства производных величин соответственно 0,08–0,15 и 0,40–0,60, получаемых обычно для белковых кристаллов. Окончательная величина средней статистической оценки $\langle m \rangle$, равной среднему значению косинуса ошибки фазового угла, составила 0,71.

Согласно рис. 3, на краю 4 Å-области разрешения отношения $\langle F_T \rangle / \langle \epsilon \rangle$ приближаются к единице, и, следовательно, эти данные не могут быть использованы при более высоком разрешении. Величина статистической оценки $\langle m \rangle$ на краю 4 Å-зоны составляет $\sim 0,6$. Таким образом, для повышения разрешения необходимо получить более качественные кристаллы L-белка и их тяжелоатомные производные.

Приблизительный коэффициент перевода структурных факторов в абсолютную шкалу был определен по кривой Вильсона [21], построенной по набору рефлексов нативного белка в области разрешения 3 Å. В соответствии с полученным коэффициентом абсолютное значение максимальной электронной плотности составило $1,036$ е/Å³, что близко к соответствующим значениям для других белков при разрешении 4 Å.

Абсолютная конфигурация молекулы белка была установлена путем построения разностного синтеза Фурье для $K_2Pt(NO_3)_3Br$ -производного, снятого с фриделевскими парами, в котором использовались только разности аномального рассеяния на тяжелом ионе — так называемый «аномальный разностный» синтез [22]. Такой синтез позволяет выявить положительные пики в положениях тяжелых атомов в случае верного энантиомера и отрицательные — в случае неверного. Правильность выбора системы координат подтвердилась в дальнейшем в ходе анализа карты электронной плотности L-белка при разрешении 4 Å правой закруткой β -сегментов в β -листах и правой закруткой наиболее четко видимых α -спиралей в обоих доменах молекулы. На рис. 4 представлен фрагмент карты электронной плотности L-белка, соответствующий α -спиральному участку полипептидной цепи (около четырех витков). На карте электронной плотности при разрешении 5 Å такие участки проявлялись в виде непрерывных стержней с повышенной электронной плотностью [11].

ваний в меньших концентрациях — к существенным изменениям параметров кристаллической ячейки, при которых попытки обнаружить на разностных синтетах соответствующую связанной аминокислоте дополнительную электронную плотность не могли привести к успеху. Это может быть вызвано конформационными изменениями молекулы L-белка при связывании L-лейцина, что приводит ко все более значительным изменениям всей кристаллической решетки по мере заполнения активных центров белковых молекул специфически связывающимися молекулами аминокислоты.

Авторы выражают большую благодарность Ю. А. Овчинникову за ценные советы и обсуждение результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Furlong C. E., Weiner T. H. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1970, v. 38, № 6, p. 1076—1083.
2. Антонов В. К., Александрова С. Л. *Биоорганическая химия*, 1977, т. 3, № 5, с. 581—599.
3. Furlong C. E., Schellenberg G. D. In: *Microorganisms and Nitrogen Sources* / Ed. Payne J. W. Brisbane: John Wiley and Sons, 1980, p. 89—123.
4. Aidanova N. A., Grinkevich V. A., Arzamazova N. M., Moroz I. N., Grinkevich Ch. A., Akimenko Z. A., Nazimov I. V., Gavrilova N. A. *FRG — USSR Symposium on Chemistry of Peptides and Proteins. Abstracts*, 1978, p. 91—93. Tubingen, FRG.
5. Meador W. E., Quijcho F. A. *J. Mol. Biol.*, 1978, v. 123, № 3, p. 499—502.
6. Quijcho F. A., Meador W. E., Pflugrath J. W. *J. Mol. Biol.*, 1979, v. 133, № 1, p. 181—184.
7. Quijcho F. A., Phillips G. N., Parsons R. G., Hogg R. W. *J. Mol. Biol.*, 1974, v. 86, № 2, p. 491—493.
8. Quijcho F. A., Pflugrath J. W. *J. Biol. Chem.*, 1980, v. 255, № 14, p. 6559—6561.
9. Newcomer M. E., Gilliland G. L., Quijcho F. A. *J. Biol. Chem.*, 1981, v. 256, № 24, p. 13213—13217.
10. Траханов С. Д., Бычковская Е. Э., Цыганник И. Н., Плетнев В. З. *Биоорганическая химия*, 1982, т. 8, № 2, с. 172—176.
11. Цыганник И. Н., Нуднов В. Ю., Траханов С. Д., Кузин А. П., Плетнев В. З. *Биоорганическая химия*, 1983, т. 9, № 1, с. 5—10.
12. Blow D. M., Crick F. H. C. *Acta crystallogr.*, 1959, v. 12, part 10, p. 794—802.
13. Phillips G. N., Mahajan V. K., Siu A. K. Q., Quijcho F. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1976, v. 73, № 7, p. 2186—2190.
14. Quijcho F. A., Gilliland G. L., Phillips G. N. *J. Biol. Chem.*, 1977, v. 252, № 14, p. 5142—5149.
15. Антонов В. К., Арсеньева Е. Л., Гаврилова Н. А., Гинодман Л. М., Крылова Ю. Л. *Биохимия*, 1973, т. 38, № 2, с. 1294—1297.
16. North A. C. T., Phillips D. C., Mathews F. S. *Acta crystallogr.*, 1968, A24, part 3, p. 351—359.
17. Muirhead H., Cox T. M., Mazarella L., Perutz M. F. *J. Mol. Biol.*, 1967, v. 28, № 1, p. 117—150.
18. Dickerson R. E., Kendrew J. C., Strandberg B. E. *Acta crystallogr.*, 1961, v. 14, part 11, p. 1188—1195.
19. Dickerson R. E., Weinzierl J. E., Palmer R. A. *Acta crystallogr.*, 1968, v. 24, part 8, p. 997—1003.
20. Плетнев В. З., Цыганник И. Н., Попович В. А. *Кристаллография*, 1983, т. 28, вып. 4, с. 708—712.
21. Wilson A. T. C. *Acta crystallogr.*, 1949, v. 2, p. 318—321.
22. Kraut J., High D. F., Sieker L. C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1964, v. 51, № 5, p. 839—845.

Поступила в редакцию
27.IX.1983

THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF LEUCINE-SPECIFIC PROTEIN FROM *E. COLI* AT 4 Å RESOLUTION

TSYGANNIK I. N., NUDNOV V. Yu., TRAKHANOV S. D.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Leucine-specific protein (LSP, M_r 37 000) from periplasmic space of *E. coli* involved in high affinity ($K_d \sim 10^{-7}$ M) transport of L-leucine has been crystallized by dialysis against 2-methyl-2,4-pentanediol solution. The obtained crystals belong to the space

group $P2_12_12_1$, a 68,8, b 69,4, c 74,2 Å, one molecule per asymmetric unit. Five isomorphous derivatives were prepared by soaking in different platinum salts. The heavy atoms in the derivatives were localized using direct X-ray methods. The mean figures of merit were 0,80 at 5 Å resolution and 0,71 at 4 Å resolution. Both 5 and 4 Å resolution electron density maps indicate that the LSP molecule is ellipsoidal with approximate dimensions 40×40×75 Å. It consists of two similar domains connected by a narrow neck and a relatively small irregular polypeptide chain loop which is arranged above interdomain space. Each domain represents a twisted β -sheet structure consisting of five-six apparently parallel strands and surrounded by four α -helices of three-four turns each. The 4 Å resolution electron density maps do not permit unambiguous polypeptide chain tracing, but structural similarity of LSP with other binding proteins from *E. coli* is obvious. The polypeptide chain intersects the interdomain LSP molecule space three-four times. One of the domains is slightly larger than the other, and their relative arrangement forms a well-defined cleft in the interdomain space where the *L*-leucine binding site may be located.