



УДК 547.96.02:548.73

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ
РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ЛЕЙЦИН-СПЕЦИФИЧНОГО БЕЛКА *ESCHERICHIA COLI*

Траханов С. Д., Бычкова Е. Э., Цыганик И. П.,
Шлетнев В. З.

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

Лейцин-специфичный белок, участвующий в системе высокоаффинного транспорта L-лейцина в *Escherichia coli*, закристаллизован в форме, подходящей для рентгеноструктурных исследований. Кристаллы принадлежат к пространственной группе $P2_12_12_1$ с параметрами элементарной ячейки a 68,85, b 63,35, c 74,00 Å, Z 4. Размеры кристаллов, их относительная устойчивость при облучении и качество дифракционного поля открывают возможность получения трехмерной структуры молекулы с высоким разрешением. В статье сопоставляются кристаллографические параметры лейцин-специфичного белка и других связывающих белков, полученных в кристаллическом состоянии.

Лейцин-специфичный белок, выделенный Фурлонгом и Вейпером [1], принадлежит к классу белков периплазматического пространства грамотрицательных микроорганизмов. Эти белки, выделяемые в результате холодного осмотического шока без нарушения внутренней мембраны бактерий, вовлечены в клетке в систему высокоаффинного транспорта низкомолекулярных метаболитов, обеспечивающую оптимальный ответ клетки на изменяющиеся внешние условия среды (см. обзоры [2—7]). Будучи специфическими рецепторами определенных необходимых клетке метаболитов, связывающие белки должны участвовать по крайней мере в двух видах взаимодействий: в связывании метаболитов и во взаимодействии с белковыми компонентами внутренней мембраны бактерии (пермеазами), которые обеспечивают транслокацию низкомолекулярных лигандов внутрь клетки [8].

По способности образовывать комплексы с теми или иными лигандами связывающие белки подразделяются на белки, связывающие аминокислоты, моносахариды, гликозиды, витамины и некоторые ионы.

Эти белки отличаются чрезвычайно высоким средством к соответствующим субстратам с K_d 10^{-6} — 10^{-8} М, при этом, как показано в ранних работах, не обладают по отношению к субстратам какими-либо ферментативными активностями. Связывающие белки характеризуются весьма близкими молекулярными массами в диапазоне примерно 25—40 кДа и низким содержанием тиоловых групп, которые, как правило, образуют один дисульфидный мостик на молекулу белка. Аминокислотный состав белков не показывает каких-либо особенностей, отличающих их от обычных глобулярных белков [5].

Вышеприведенные свойства связывающих белков стимулируют развертывание работ по изучению их структурно-функциональных зависимостей.

Первичные структуры Leu-He-Val-связывающего белка (LIV-белок) [9] и Ara-связывающего белка [10] из *Escherichia coli* и сульфатсвязывающего белка из *Salmonella typhimurium* [11] были опубликованы. Установленная к настоящему времени большая часть первичной структуры Leu-специфичного белка (L-белок) показывает высокую степень гомологии с первичной структурой LIV-белка [12].

В таблице представлены кристаллографические параметры связывающих белков, исследуемых рентгеноструктурными методами. Рентгенострук-

Кристаллографические параметры некоторых связывающих белков

Параметр	L-Ага-связывающий белок <i>E. coli</i> В/г	Мальтоза-связывающий белок <i>E. coli</i> К12	D-Gal-связывающий белок		LIV-белок <i>E. coli</i> К12	I-белок <i>E. coli</i> К12	Сульфат-связывающий белок <i>S. typhimurium</i>
	<i>E. coli</i> В/г	<i>E. coli</i> В/г	<i>E. coli</i> В/г	<i>S. typhimurium</i> ST1			
Молекулярная масса, Да	33 100	40 500	32 000	33 000	37 200	37 500	33 000
Пространственная группа	$P2_1, 2_1$	$P2_1$	$P2_1$	$C2$	$P2_1, 2_1$	$P2_1, 2_1, 2_1$	$P2_1, 2_1, 2_1$
<i>a</i> , Å	55,44	57,7	66,00	119,7	39,68	68,85	40,9
<i>b</i> , Å	71,72	65,1	37,05	37,2	70,77	69,35	49,6
<i>c</i> , Å	77,64	44,7	61,57	80,1	115,01	74,00	141,5
β		$100^\circ 40'$	$106^\circ 29'$	$123^\circ 24'$			
<i>V</i> , Å ³	308,700	164 000	144 400	298 000	323 000	353 300	287 000
Число молекул на элементарную ячейку (<i>Z</i>)	4	2	2	4	4	4	4
<i>V</i> _м , Å ³ /Да	2,33	2,03	2,26	2,26	2,30	2,36	2,17
Плотность кристаллов, г/см ³	1,24	1,23	1,28	—	1,29	—	1,25
Ссылки	[13]	[14]	[14, 15]	[16]	[17, 14]	Наша статья	[14]

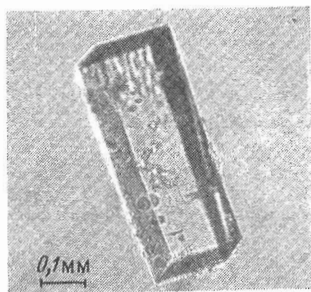


Рис. 1

Рис. 1. Микрофотография кристалла L-белка

Рис. 2. Прецессионные рентгенограммы цулевых слоевых зон $h0l$ (а) и $0kl$ (б) при угле прецессии μ 20° и времени экспозиции 40 ч (расстояние кристалл — пленка 60 мм)

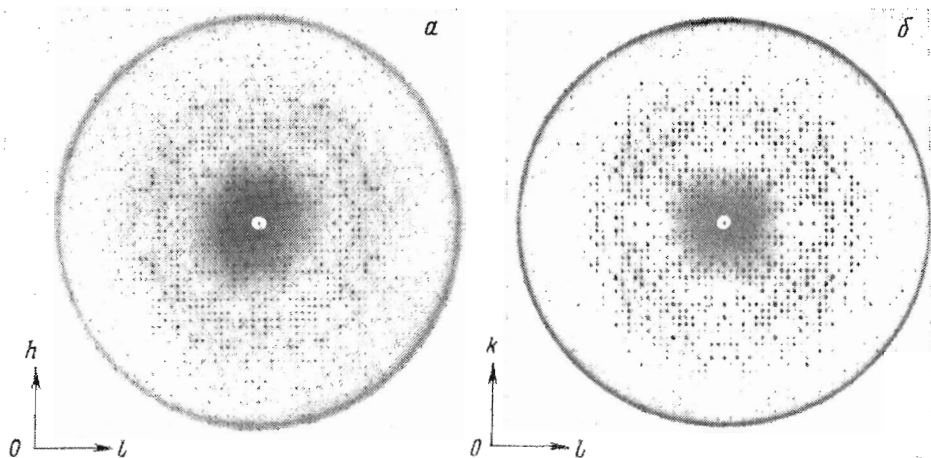


Рис. 2

турное исследование одного из этих белков, Ага-связывающего, отражено в серии статей [13, 18, 19] и к настоящему времени ознаменовалось получением трехмерной структуры молекулы с разрешением 2,4 Å [20]. Определенным успехом в этом направлении является также получение пространственной структуры с низким разрешением для Gal-связывающего белка [15].

Анализируя данные рентгеноструктурных исследований Ага-связывающего белка, а впоследствии и Gal-связывающего, Квочо [15] постулировал существование двухдоменной структуры не только для указанных белков, но и для всего семейства связывающих белков периплазматического пространства. Существование двух доменов, соединенных шарнирной областью, косвенно подтвердил метод микрокалориметрии [21]. Эта модель согласуется также с нашими данными, полученными спектральными методами как для LIV- [22], так и для L-белка [23]. При связывании субстратов LIV- и L-белками были обнаружены значительные изменения в их спектрах флуоресценции, КД, УФ и КР, которые могут быть объяснены «схлопыванием» доменов при комплексообразовании без нарушения вторичной структуры молекулы.

В настоящем сообщении приведены данные по кристаллизации Leu-специфичного белка *E. coli* и рентгеноструктурные параметры полученных кристаллов.

L-Белок выделяли по методике, описанной в работе [24], либо по методике, в которой препаративное изофокусирование было заменено гель-фильтрацией на ультрагеле Ас А54 (ЛКВ, Швеция). На всех стадиях очистки, особенно на начальных, широко применялась ультрафильтрация с использованием отечественных синтетических мембран. По данным электрофореза в трис-глицериновой системе, электрофореза в присутствии

Na-додецилсульфата и анализа N-концевой аминокислоты, обе схемы очистки давали гомогенный L-белок. Белок был высокоактивен по связыванию радиоактивного L-лейцина.

Условия кристаллизации выявляли, варьируя pH среды и концентрацию высаживающего агента. В качестве высаживающего агента использовали 2-метил-2,4-пентандиол и полиэтиленгликоль (M 6000 Да). Кристаллы L-белка были получены диализом в микродиализных ячейках в 20 мМ Na-ацетатном буфере при значениях pH 3,7; 4,0; 4,3 и при концентрации метилпентандиола 46—52% (v/v). Объем белка на ячейку составлял 15—20 мкл. Оптимальные условия кристаллизации, соответствующие 50% (по объему) метилпентандиола в 20 мМ Na-ацетатном буфере, pH 4,3, и концентрации белка ~10 мг/мл, позволили получить пригодные для рентгеноструктурного анализа кристаллы со средними размерами $0,2 \times 0,2 \times 0,6$ мкм³ (рис. 1).

Прецессионные рентгенограммы (рис. 2) снимали на генераторе GX-6 (Elliott, Англия) с использованием $\text{CuK}\alpha$ -излучения острофокусной трубки с вращающимся анодом.

Отсутствие нечетных осевых отражений на рентгенограммах зон $hk0$, $h0l$ и $0kl$ позволило отнести кристаллы L-белка к орторомбической пространственной группе $P2_12_12_1$ с параметрами элементарной ячейки a 68,85, b 69,35, c 74,00 Å; V 353 300 Å³.

По известной молекулярной массе белка и объему элементарной ячейки был вычислен параметр Мэтьюза (V_M).

В предположении, что на элементарную ячейку приходится четыре молекулы белка, т. е. одна молекула белка на независимую часть ячейки, вычисленная величина V_M (2,36 Å/Да) попадает в диапазон значений, характерных для закристаллизованных глобулярных белков [25], и к тому же очень близко соответствует значениям V_M , приведенным для других связывающих белков (таблица).

На основании параметра Мэтьюза и удельного парциального объема (\bar{v} 0,73 см³/г), вычисленного по аминокислотному составу, было определено объемное содержание растворителя в кристалле [26]:

$$\delta = 1 - \frac{1,66 \bar{v}}{V_M} = 0,47.$$

Дифракционное поле полученных кристаллов (по меньшей мере 2,5 Å) и их сравнительная устойчивость под пучком (максимальное падение интенсивности контрольных рефлексов достигало 20% приблизительно за 50 ч экспозиции в рентгеновском пучке при режиме работы трубки автодифрактометра 50 кВ и 20 мА) открывают возможности изучения трехмерной структуры молекулы с высоким разрешением.

В настоящее время начат поиск изоморфных производных полученных кристаллов наряду с поиском других кристаллических форм лейцин-специфичного белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Furlong C. E., Weiner J. H. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1970, v. 38, № 6, p. 1076—1083.
2. Oxender D. L. Ann. Rev. Biochem., 1972, v. 41, p. 777—814.
3. Boos W. Ann. Rev. Biochem., 1974, v. 43, p. 123—146.
4. Oxender D. L., Quay S. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, v. 264, p. 358—373.
5. Антонов В. К., Александров С. Л. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 5, с. 581—599.
6. Furlong C. E., Schellenberg G. D. In: Microorganisms and Nitrogen Sources / Ed. Payne J. W. John Wiley and Sons, Brisbane, 1980, p. 89—123.
7. Wilson D. B., Smith J. B. In: Bacterial Transport / Ed. Rosen B. P. New York: Marcel Dekker, 1978, p. 495—557.
8. Lo Th. C. Y. Can. J. Biochem., 1979, v. 57, № 4, p. 289—301.
9. Ovchinnikov Yu. A., Aldanova N. A., Grinkevich V. A., Arzamazova N. M., Moroz I. N. FEBS Lett., 1977, v. 78, № 2, p. 313—316.
10. Hogg R. W., Hermadson M. A. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 14, p. 5135—5141.
11. Ishihara H., Hogg R. W. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 10, p. 4614—4618.
12. Солдатова Л. Н., Шахпаронов М. И., Чертова Е. Н., Алданова Н. А. Всес. симпозиум по химии и физике белков и пептидов. Тез. докл. 1980, с. 124.

13. Quioco F. A., Phillips G. N., Jr., Parsons R. G., Hogg R. W. *J. Mol. Biol.*, 1974, v. 86, p. 491-493.
14. Quioco F. A., Meador W. E., Pflugrath J. W. *J. Mol. Biol.*, 1979, v. 133, p. 181-184.
15. Quioco F. A., Pflugrath J. W. *J. Biol. Chem.*, 1980, v. 255, № 14, p. 6559-6561.
16. Alber T., Fahnestock M., Mowbray S. L., Petsko G. A. *J. Mol. Biol.*, 1981, v. 147, p. 471-474.
17. Meador W. E., Quioco F. A. *J. Mol. Biol.*, 1978, v. 123, p. 499-502.
18. Phillips G. N., Jr., Mahajan V. K., Siu A. K. Q., Quioco F. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1976, v. 73, № 7, p. 2186-2190.
19. Quioco F. A., Gilliland G. L., Phillips G. N., Jr. *J. Biol. Chem.* 1977, v. 252, № 14, p. 5142-5149.
20. Gilliland G. L., Quioco F. A. *J. Mol. Biol.*, 1981, v. 146, p. 341-362.
21. Gaudin C., Marty B., Ragot M., Sari J. C., Belaich J. P. *Biochimie*, 1980, v. 62, p. 741-746.
22. Ворогынцева Т. И., Сурип А. М., Траханов С. Д., Набиев И. Р., Антонов В. К. *Биоорган. химии*, 1981, т. 7, № 1, с. 45-57.
23. Nabiev I., Trakhanov S., Surin A., Vorotyntseva T., Efremov E., Pletnev V. *Proc. III USSR-BRD symp. on pept. and prot. res. New York*, in press.
24. Антонов В. К., Арсеньева Е. Л., Газрилова Н. А., Гинопдман Л. М., Крылова Ю. И. *Биохимия*, 1973, т. 38, № 8, с. 1294-1297.
25. Matthews B. W. *J. Mol. Biol.*, 1968, v. 33, p. 491-497.
26. Matthews B. W. In: *The proteins*, 3rd Ed / Eds Neurath H., Hill R. L. San Fransisco — London: Acad. Press, 1977, p. 404-590.

Поступила в редакцию
12.VIII.1981

CRYSTALLIZATION AND PRELIMINARY X-RAY STUDIES OF LEUCINE-SPECIFIC PROTEIN FROM *ESCHERICHIA COLI*

TRAKHANOV S. D., BYCHKOVSKAYA E. E., TSIGANNIK I. N.,
PLETNEV V. Z.

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

Leucine-specific protein from *Escherichia coli* has been crystallized in a form suitable for the X-ray analysis. The crystals belong to the orthorhombic space group $P2_12_12_1$ with cell parameters a 68,85, b 63,35, c 74,00 Å, Z 4. The crystal dimensions, their relative stability to X-ray irradiation and quality of the diffraction pattern should permit the structure determination at high resolution. The crystallographic parameters of the leucine-specific protein are compared with those of other binding proteins.