



УДК 577.322.6

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА
ЛЕЙЦИН-СПЕЦИФИЧНОГО БЕЛКА ПРИ РАЗРЕШЕНИИ 5 ÅЦыганник И. Н., Нуднов В. Ю., Траханов С. Д.,
Евзин А. П., Петнев В. З.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемкина
Академии наук СССР, Москва

Лейцин-специфичный белок (L-белок, M_r 37 000), выделенный из периплазматического пространства *E. coli* и участвующий в системе высокоаффинного транспорта L-лейцина, кристаллизуется в пространственной группе $P2_12_12_1$ с параметрами ячейки a 68,8, b 69,4, c 74,2 Å и Z 4. Пространственная структура L-белка при разрешении 5 Å была определена рентгеновскими методами на основе экспериментальных данных, полученных от нативного белка и пяти изоморфных производных. На этапе решения фазовой проблемы локализация тяжелых атомов в производных была осуществлена с помощью прямых методов. Молекула имеет форму вытянутого эллипсоида с приблизительно теми же размерами 43×43×76 Å. Пространственная структура белка представляет собой два глобулярных домена, разделенных в центральной части эллипсоида суженным перешейком. Относительная упаковка доменов образует в области перешейка полость в форме щели. Распределение электронной плотности на карте, данные КД и статистического анализа указывают на наличие в молекуле заметного содержания α -спиральной и, по-видимому, β -складчатой структур. Отмечено топологическое сходство пространственных организаций L-белка, а также L-арабинозо- и D-галактозосвязывающих белков из *E. coli*.

Лейцин-специфичный белок (L-белок, M_r 37 000) из периплазматического пространства *E. coli* обладает исключительно высоким сродством к L-лейцину ($K_d \sim 3 \cdot 10^{-7}$ М) и участвует в системе его транспорта [1, 2]. По своей первичной структуре, функциональному поведению (и, по всей вероятности, пространственной организации) он сходен с лейцин-изолейцин-валинсвязывающим белком [3]; предварительные рентгеноструктурные исследования последнего проведены Меадором и Квочо [4].

Ранее были опубликованы данные по кристаллизации и предварительному рентгеновскому изучению L-белка [5], а также результаты по локализации тяжелых атомов в его изоморфных производных прямыми рентгеновскими методами*.

Настоящее сообщение посвящено описанию пространственной структуры L-белка с разрешением 5 Å.

Карта электронной плотности исследуемого объекта (масштаб 0,37 см/Å) была рассчитана на 72 сечениях через 1,03 Å вдоль оси z с использованием центроидных фаз [6] по рефлексам, измеренным от нативного белка и пяти производных в области от 20 до 5 Å с ограничением $F > 0,5$ (см. «Экспериментальную часть»). Выбранные уровни минимального и максимального контуров на карте равны соответственно 1 и 11 (отн. ед.).

Анализ карты электронной плотности показал, что L-белок имеет вытянутую двухдоменную структуру. Границы молекулы располагаются в интервалах по x от 0,18 до 0,90, по y от -0,16 до 0,60, по z от 0,68 до 1,71 (рис. 1а-в). На карте хорошо просматривается серия относительно длинных стержнеобразных участков с повышенной непрерывной плотностью, которые, по-видимому, относятся к α -спиралям (рис. 1г); четыре из них обнаружены в одном домене (А) и пять в другом (В).

Приблизительная локализация стержней в домене А по оси z (в скобках приведена общая длина в ангстремах): 0—0,17 (15), 0,75—0,87 (12),

* Статья будет опубликована в ближайших номерах журнала «Кристаллография».

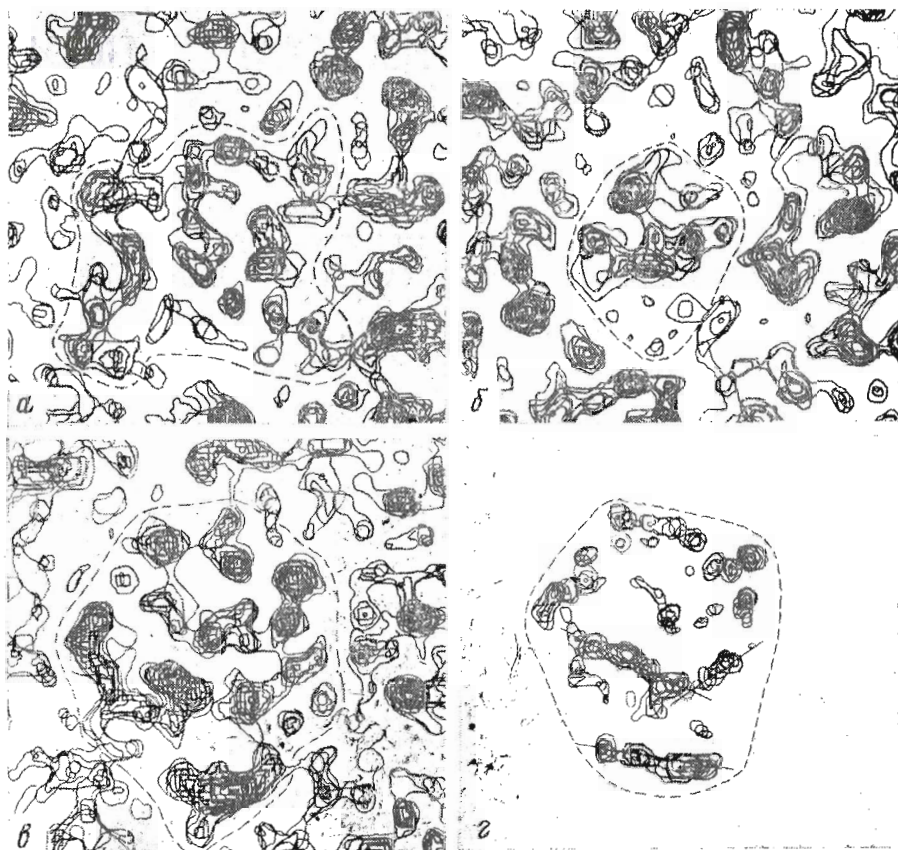


Рис. 1. Фрагменты 5 А-карты электронной плотности из слоев наложенных сечений $xу$ со смещением вдоль y на $-0,2$ доли соответствующего ребра: а — слой домена А, z 0,85–0,90; б — слой междоменного перешейка, z 0,10–0,15; в — слой домена В, z 0,34–0,39; г — слой z 0,26–0,47, прямыми линиями показаны оси α -спиральных участков с величиной минимального контура, равной 5 (отн. ед.)

0,79–0,96 (15), 0,92–1,07 (15); в домене В: 0,22–0,40 (26); 0,26–0,47 (30); 0,31–0,43 (13); 0,33–0,60 (25); 0,35–0,51 (16). Исходя из суммарной величины длин данных участков содержание α -спиралей в структуре составляет не менее 33%.

Отдельные фрагменты регулярной β -структуры на модели L-белка также видны, хотя идентификация данного типа вторичной структуры при выбранном разрешении гораздо менее однозначна.

Комбинированный анализ вторичной структуры L-белка двумя принципиально различающимися методами [7–9] оценивает содержание α -спиральных и β -структурных участков как 45 и 20% соответственно*. Определение содержания соответствующих структур по спектрам кругового дихроизма дает величины 30 и 40%. Модель L-белка (масштаб 0,37 см/Å) была построена, включая всю плотность выше уровня 1 (рис. 2).

Молекула имеет форму вытянутого вдоль оси z эллипсоида с протяженностью по осям $43 \times 43 \times 76$ Å. Как уже отмечалось, она состоит из двух ярко выраженных, близких по размерам глобулярных доменов (А и В), расположенных в разных половинах эллипсоида и разделенных в центральной части суженным перешейком. Относительное совмещение доменов может быть осуществлено поворотом одного из них вокруг параллельной z некристаллографической оси на $\sim 90^\circ$ и трансляцией вдоль этой оси на ~ 37 Å. В области перешейка между доменами расположена хорошо заметная полость, имеющая форму щели. Глубина щели примерно в 3 раза

* Экспериментальные данные будут опубликованы особо.

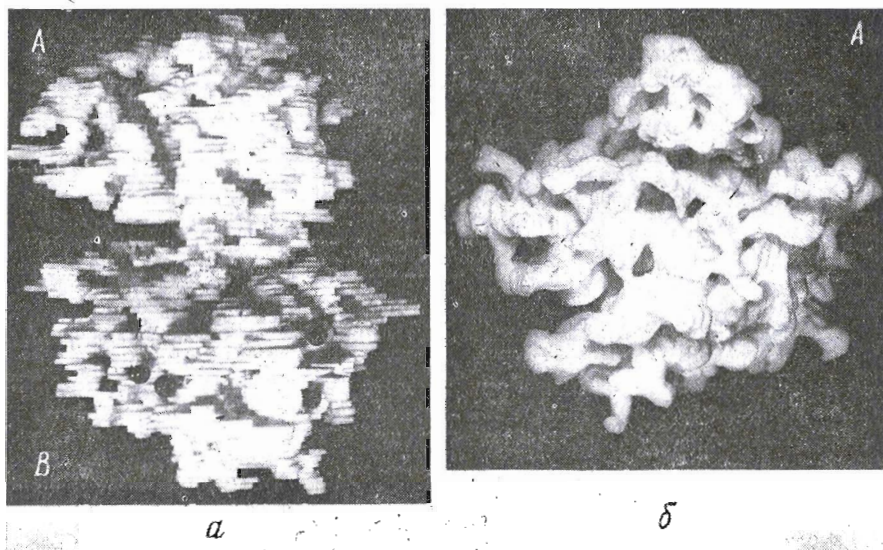


Рис. 2. Модель молекулы лейцин-специфичного белка при разрешении 5 Å; буквами А и В обозначены домены. а — вид вдоль оси y , шариками обозначены центры связывания тяжелых атомов в изоморфных производных; б — вид вдоль оси z

больше ее высоты. Не исключено, что она играет важную функциональную роль в специфическом связывании L-лейцина. Как показал анализ, основные места посадки тяжелых атомов в пяти использованных производных общие; 18 из 20 найденных координатных точек (табл. 1) распределяются всего лишь по четырем центрам со средними координатами: I (0,604; 0,367; 0,254), II (0,585; 0,305; 0,120), III (0,536; 0,468; 0,450), IV (0,575; 0,430; 0,418). Успех в решении фазовой проблемы в этом случае определялся заметно различающимися величинами коэффициентов заполнения центров связывания в разных производных. Области I, III, IV связывания тяжелых атомов располагаются на поверхности домена В. Центр II находится в глубине междоменного кармана, указывая на доступность его внутренних областей для больших заряженных (в основном отрицательно) ионов. Во всех пяти производных домен А характеризуется полным отсутствием центров связывания тяжелых атомов.

И наконец, следует отметить, что уже при разрешении 5 Å наблюдается явное топологическое сходство пространственных организаций L-белка и других связывающих белков из *E. coli* — L-арабинозо- и D-галактозосвязывающих белков (ср. данные работ [10, 11]).

Экспериментальная часть

Лейцин-специфичный белок выделяли по методике, описанной в работе [12]. Кристаллы белка выращивали в течение 3–4 недель при 4°С диализом относительно противораствора 50% 2-метил-2,4-пентандиола в 20 мМ NaOAc-буфере, pH 4,3, и концентрации белка 10 мг/мл [5]. Полученные кристаллы ($P2_12_1$; a 68,8, b 69,4, c 74,2 Å, Z 4) имели призматическую форму со средними размерами 0,2×0,2×0,6 мм и характеризовались дифракционным полем до разрешения 3 Å.

Кристаллические производные получены на основе солей $K_2Pt(NO_3)_3Br$, K_2PtCl_6 , $Pt(NH_3)_2Cl_2$, $K_2Pt(NO_3)_4$, $Pt(NH_2)_2(CH_3)_2Cl_2$ методом диффузии соответствующих тяжелых ионов через диализную мембрану*.

Сбор экспериментальных данных проводился ω -методом на четырехкружном дифрактометре РІ (Syntex) при 18°С (излучение $CuK\alpha$, графитовый монохроматор, фокус трубки 0,4×1 мм, режим работы трубки 40 кВ и 30 мА). Интервал сканирования 0,4–0,6 град, число шагов на профиле пика 11. Число измеренных рефлексов с $I > 3\sigma(I)$ и $I > 10\sigma(I)$ было соот-

* См. список на с. 5.

Уточненные параметры центров связывания тяжелых атомов *

| Производное | x | y | z | g |
|---|-------|-------|-------|------|
| K ₂ Pt(NO ₃) ₃ Br | 0,599 | 0,372 | 0,255 | 1,14 |
| | 0,584 | 0,307 | 0,117 | 0,94 |
| | 0,523 | 0,478 | 0,447 | 0,77 |
| | 0,277 | 0,396 | 0,334 | 0,12 |
| K ₂ PtCl ₆ | 0,600 | 0,366 | 0,254 | 0,29 |
| | 0,589 | 0,305 | 0,119 | 1,13 |
| | 0,534 | 0,468 | 0,451 | 0,45 |
| Pt(NH ₃) ₂ Cl ₂ | 0,608 | 0,362 | 0,254 | 0,43 |
| | 0,584 | 0,304 | 0,122 | 1,30 |
| | 0,531 | 0,463 | 0,452 | 0,75 |
| | 0,574 | 0,438 | 0,428 | 0,39 |
| K ₂ Pt(NO ₃) ₄ | 0,600 | 0,370 | 0,255 | 1,55 |
| | 0,588 | 0,305 | 0,118 | 1,36 |
| | 0,527 | 0,476 | 0,446 | 0,78 |
| | 0,579 | 0,431 | 0,409 | 0,14 |
| | 0,257 | 0,394 | 0,477 | 0,11 |
| Pt(NH ₂) ₂ (CH ₂) ₂ Cl ₂ | 0,614 | 0,367 | 0,254 | 0,42 |
| | 0,582 | 0,306 | 0,123 | 0,56 |
| | 0,556 | 0,453 | 0,452 | 0,41 |
| | 0,571 | 0,420 | 0,416 | 0,88 |

* Координаты тяжелых атомов приведены к одной молекуле белка; *g* — коэффициент заполнения в произвольной шкале.

ответственно не ниже 75 и 50% от общего числа. Падение интенсивности трех контрольных рефлексов кристаллов нативного белка и производных после съемки не превышало соответственно 10 и 20%.

Обработка измеренных отражений (1762 в сфере разрешения 5 Å) включала коррекцию на *Lp*-фактор и поглощение [13], а также поправку на падение интенсивности (дрейф) вследствие радиационного поражения. Фактор *R*, рассчитанный по наборам с двух кристаллов нативного белка, составил 8%.

Для локализации мест посадок тяжелых атомов в первых четырех производных L-белка были успешно применены прямые рентгеновские методы*. Соответствующие трансляционные компоненты при сведении координат тяжелых атомов разных производных к одному началу, а также центры связывания в пятом производном (Pt(NH₂)₂(CH₂)₂Cl₂) были найдены с помощью разностных синтезов Фурье, вычисленных по коэффициентам $\Delta F \exp(i\varphi_p)$. Здесь, на первом этапе, приближенные фазы структурных факторов нативного белка φ_p были найдены обычным методом изоморфного замещения [14] по известной тяжелоатомной структуре K₂Pt(NO₃)₄-производного (использовались усредненные величины по двум возможным значениям фаз). На последующих этапах были привлечены остальные производные.

Уточнение параметров тяжелых атомов и коэффициентов шкалирования производных осуществляли методом наименьших квадратов попеременно с этапами перевычисления фаз структурных амплитуд [14—16] по 1631 рефлексу в интервале разрешения 20 Å > *d* ≥ 5 Å с ограничением *F* > 0,5. Уточнение проводили в приближении анизотропного теплового движения атомов. Окончательная величина средней статистической оценки $\langle m \rangle$ (равной среднему значению косинуса ошибки фазового угла) составила 0,80. Статистические данные уточнения фазовых углов, а также уточненные параметры тяжелых атомов для пяти производных L-белка приведены соответственно в табл. 2 и 1.

* См. сноску на с. 5.

Статистические данные уточнения фаз по рефлексам в 5 Å-области разрешения

| Производное | R_F | R_{Kraut} | R_{stand} | $rmsF_H/rmsE$ |
|--------------------------|-------|-------------|-------------|---------------|
| $K_2Pt(NO_3)_3Br$ | 0,21 | 0,10 | 0,49 | 2,17 |
| K_2PtCl_6 | 0,15 | 0,07 | 0,49 | 2,11 |
| $Pt(NH_3)_2Cl_2$ | 0,19 | 0,08 | 0,45 | 2,42 |
| $K_2Pt(NO_3)_4$ | 0,25 | 0,09 | 0,40 | 2,80 |
| $Pt(NH_2)_2(CH_2)_2Cl_2$ | 0,18 | 0,09 | 0,54 | 1,87 |

Примечание: средняя статистическая оценка (среднее значение косинуса ошибки фазового угла) $\langle m \rangle = 0,80$. $R_F = \frac{\sum_{hkl} |F_{PH} - F_P|}{\sum_{hkl} F_P}$; $R_{Kraut} = \frac{\sum_{hkl} |F_{PH} - |\vec{F}_P + \vec{F}_H||}{\sum_{hkl} F_{PH}}$ (17); $R_{stand} = \frac{\sum_{hkl} |F_{PH} - |\vec{F}_P - \vec{F}_H||}{\sum_{hkl} |F_{PH} - F_P|}$. $rmsF_H = \left[\frac{\sum_{hkl} F_H^2}{N} \right]^{1/2}$, $rmsE = \left[\frac{\sum_{hkl} \varepsilon^2}{N} \right]^{1/2}$, где ε — ошибка замкнутости фазового треугольника, N — число рефлексов.

Авторы выражают большую благодарность Ю. А. Овчинникову за обсуждение результатов и ценные советы, а также П. В. Костецкому за оказание помощи при проведении статистического анализа вторичной структуры исследуемого белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В. К., Александров С. Л. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 5, с. 581–599.
2. Furlong C. E., Schellenberg G. D. In: Microorganisms and Nitrogen Sources/Ed. Payne J. W. Brisbane: John Wiley and Sons, 1980, p. 89–123.
3. Aldanova 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.
4. Meador W. E., Quijcho F. A. J. Mol. Biol., 1978, v. 123, p. 499–502.
5. Траханов С. Д., Бычкова Е. Э., Цыганник Н. Н., Плернев В. З. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 2, с. 172–176.
6. Blow D. M., Crick F. H. C. Acta crystallogr., 1959, v. 12, part 10, p. 794–802.
7. Argos P., Palau J. Int. J. Peptide Protein Res., 1982, v. 19, № 2, p. 380–393.
8. Chou P. Y., Fasman G. D. J. Mol. Biol., 1977, v. 115, № 2, p. 135–175.
9. Wu T. T., Szu S. C., Jernigan R. L., Bilofsky H., Kabat E. A. Biopolymer, 1978, v. 17, № 3, p. 555–572.
10. Gilliland G. L., Quijcho F. A. J. Mol. Biol., 1981, v. 146, № 3, p. 341–362.
11. Quijcho F. A., Pflugrath J. W. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 14, p. 6559–6561.
12. Антонов В. К., Арсеньева Е. Л., Гаврилова Н. А., Гунодман Л. М., Крылова Ю. П. Биохимия, 1973, т. 38, № 8, с. 1294–1297.
13. North A. C. T., Phillips D. C., Mathews F. S. Acta crystallogr., 1968, A24, part 3, p. 351–359.
14. Muirhead H., Cox J. M., Mazarella L., Perutz M. F. J. Mol. Biol., 1967, v. 28, № 1, p. 117–150.
15. Dickerson R. E., Kendrew J. C., Strandberg B. E. Acta crystallogr., 1961, v. 14, part 11, p. 1188–1195.
16. Dickerson R. E., Weinzierl J. E., Palmer R. A. Acta crystallogr., 1968, B24, part 8, p. 997–1003.
17. Kraut J., Robertus J. D., Birktoft J. J., Alden R. A., Wilcox P. E., Powers J. C. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1971, v. 36, p. 117–123.

Поступила в редакцию
9.VIII.1982

THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF LEUCINE-SPECIFIC PROTEIN AT 5 Å RESOLUTION

TSYGANNIK I. N., NUDNOV V. Yu., TRAKHANOV S. D.,
KUZIN A. P., PLETNEV V. Z.

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

Leucine-specific protein (M. W. 37 000), isolated from periplasmic space of *Escherichia coli* and taking part in high affinity transport of L-leucine, crystallizes in the space group $P2_12_12_1$ with cell dimensions a 68,8 Å, b 69,4 Å, c 74,2 Å and Z 4. The three-dimensional structure of leucine-specific protein at 5 Å resolution was determined by x-ray methods on the basis of experimental data collected for the native protein and its five isomorphous derivatives. At the stage of solving the phase problem, the heavy atoms in the derivatives were located using direct methods. The molecule adopts the shape of elongated ellipsoid with approximate dimensions 43×43×76 Å. The protein is built of two distinct globular domains separated in the central part by a narrowed neck. The domain packing creates a well-defined cleft in the neck region. The distribution of electron density, CD and statistical analysis data indicate the presence of noticeable content of α -helical and, apparently, β -sheet structures in the molecule. The topological similarity of the overall shape of leucine-specific protein and other binding proteins from *E. coli* — *L*-arabinose- and *D*-galactose-binding proteins — was pointed out.