

© Ю.Н. ЧИРГАДЗЕ, Е.В. БРАЖНИКОВ, С.В. НИКОНОВ,
Н.П. ФОМЕНКОВА, М.Б. ГАРБЕР, А.Г. УРЖУМЦЕВ,
В.Ю. ЛУНИН, Н.Ю. ЧИРГАДЗЕ, Ю.В. НЕКРАСОВ

**КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА РИБОСОМНОГО ФАКТОРА G
ИЗ БАКТЕРИЙ THERMUS THERMOPHILUS ПРИ НИЗКОМ РАЗРЕШЕНИИ**

(Представлено академиком А.С. Спириным 5 V 1991)

Бактериальный фактор элонгации G — мономерный белок с молекулярной массой около 80 кДа. Он принимает участие в процессе биосинтеза белка на рибосоме на стадии транслокации. Взаимодействие G-фактора в комплексе с ГТФ с претранслокационной рибосомой катализирует транслокацию пептидил-тРНК из А-участка в Р-участок рибосомы. Сродство к рибосоме G-фактор приобретает в комплексе с ГТФ, при этом рибосома наводит на G-фактор ГТФазную активность. В результате этого происходит гидролиз ГТФ до ГДФ и ортофосфата, и G-фактор освобождается из комплекса с рибосомой [1]. ГТФ-связывающий центр G-фактора расположен в N-концевой части молекулы. Свойство изменять свою конформацию в комплексах с ГТФ и ГДФ, а также гомология аминокислотной последовательности объединяют G-фактор с двумя другими рибосомными факторами — EF-Tu и IF-2 [2]. Пространственная структура EF-Tu из *E. coli* определена с разрешением 2,7 Å [3].

Все ГТФ-связывающие рибосомные факторы входят в суперсемейство ГТФ-связывающих белков, к которому относятся G-белки, gas-белки, тубулин и множество ГТФаз с небольшой молекулярной массой [4, 5]. Пространственная структура, помимо EF-Tu, определена в этом суперсемействе для одного из gas-белков — продукта онкогена человека c-H-gas p21 с разрешением 2,2 Å [6].

Фактор элонгации G из экстремально-термофильной бактерии *Th. thermophilus* NB8 содержит 690 остатков в полипептидной цепи и имеет молекулярную массу 76,6 кДа [7]. Выделение и очистка термофильного фактора G были выполнены, как в работе [8]. Кристаллы выращивали методом диффузии паров в "висящей капле" при 4 °С [9]. Для стабилизации параметров элементарной ячейки кристалла в маточный 1% раствор белка, содержащий 20 мМ имидазол-HCl буфера и 3 мМ азида натрия, рН 7,8, были добавлены сульфат магния до 0,8 мМ и спермин-HCl до 0,4 мМ. Большие монокристаллы белка выращивали, используя затравочные кристаллы и технику импульсной диффузии [10]. В течение месяца выростали кристаллы размером до 0,6 × 0,4 × 0,12 мм. Кристаллы крайне чувствительны к изменениям состава и вязкости раствора, поэтому они были подвергнуты обработке глутаровым альдегидом. Последнюю проводили методом диффузии в парах с постепенным доведением глутарового альдегида до 0,25% в течение недели. Сшитые кристаллы белка переносили из маточного раствора в сохраняющий водный раствор, содержащий 1 мМ сульфата магния и 1 мМ спермина-HCl.

Кристаллы относятся к пр. гр. $P2_12_12_1$, размеры элементарной ячейки равны 76,7 × 105,5 × 116,0 Å, в независимой части ячейки находится одна молекула. Определение структуры было проведено методом изоморфных замещений. Испытано около 40 различных тяжелоатомных соединений. Однако даже лучшие производ-

Таблица 1

Фазовая статистика кристалла G-фактора в интервале разрешения 120–8 Å

Соединение. Условия введения	$R_F^{iso}, \%$	$R_F^{ano}, \%$	$R_K, \%$	$R_C, \%$	F_H^{iso}/E	F_H^{ano}/E
$CH_3HgOCOCH_3$ 2,5 мМ, 14 суток	14,4	3,6	7,7	49,2	1,57	2,28
$CH_3HgOCOCH_3$ 2,5 мМ, 3 суток	11,6	–	8,8	71,2	0,95	–
K_2PtCl_6 0,1 мМ, 7 суток	10,8	–	12,1	81,1	0,67	–

Примечание. Среднее значение фактора достоверности определения фаз $m = 0,67$ для 815 структурных амплитуд и 326 аномальных разностей.

ные, по-видимому, не являются достаточно изморфными, поскольку изменение параметров элементарной ячейки по отношению к таковым для кристалла нативного белка составляет 0,3–0,9%. Приблизительно так же меняются параметры ячейки для разных кристаллов нативного белка одной партии. Это обстоятельство значительно осложняет исследование. Дифракционные наборы в диапазоне 120–8 Å получены с помощью дифрактометра "Синтекс Р21" (США), снабженного улучшенной коллимационной системой и оптимизирующим математическим обеспечением [11]. Использовали $CuK\alpha$ -излучение, графитовый монохроматор, ω -сканирование, вводили поправки на L_p и на поглощение [12]. Измерение нормального рассеяния проводили только для одного симметричного эквивалента, при измерении аномального рассеяния применяли локальное шкалирование [13]. В набор данных включали только те отражения, для которых измеренная величина модуля структурного фактора была больше 2σ .

Фазовая проблема была решена по двум производным на основе метилмеркурацетата (ММА) и одной – на основе гексахлорплатината калия. Положения тяжелых атомов определены по харкеровским сечениям разностных синтезов Паттерсона. В первом, более сильном, ртутном производном найдено четыре места посадки, сгруппированных в виде кластера, во втором, менее контрастном, – два места. В платиновой производной найдено три места. Аномальное рассеяние измерено только для сильного ММА-производного. Достоверность аномального вклада подтверждена сходством карт разностных синтезов Паттерсона для аномальных и изморфных разностей. Полное число измеренных отражений для кристаллов нативного белка в зоне 120–8 Å равно 1009 и несколько меньше для производных. В каждом из наборов при расчете фаз удалены слабые отражения с амплитудой структурных факторов менее 0,3 от их среднего значения. В итоге получено среднее значение фактора достоверности, равное 0,67 для 815 отражений. Было использовано также 326 измеренных аномальных разностей, и с помощью аномального рассеяния определен правильный энантиомер. Фазовая статистика приведена в табл. 1.

При этом использованы обозначения:

F_H^{iso} и F_H^{ano} – среднеквадратичные значения вычисленных структурных факторов тяжелого атома при нормальном и аномальном рассеянии;

E – среднеквадратичное значение ошибки изоморфизма;

$R_F^{iso} = \sum |F_{PH} - F_P| / \sum F_P$ – относительный вклад тяжелого атома, нормальное рассеяние;

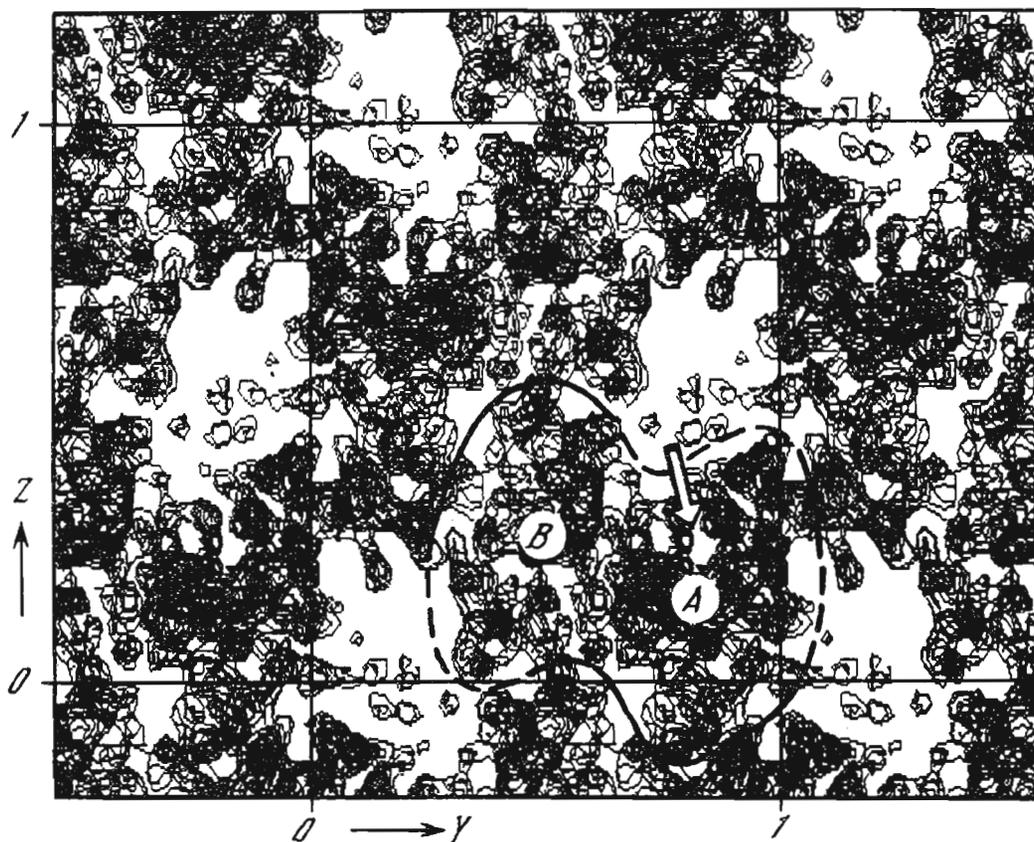


Рис. 1. Проекция YZ синтеза Фурье электронной плотности толщиной X от 0 до $1/2$ элементарной ячейки рибосомного фактора элонгации G из *Th. thermophilus* при разрешении 8 Å. Стрелка – место посадки ртутного реагента. Выведены уровни электронной плотности, соответствующие 5 и 15% занимаемого объема элементарной ячейки кристалла

$R_F^{ano} = 2 \sum |F_{PH}^+ - F_{PH}^-| / \sum |F_{PH}^+ + F_{PH}^-|$ – относительный вклад тяжелого атома, аномальное рассеяние;

$R_K = \sum |E_h| / \sum F_{PH}$ – фактор расходимости Краута по центросимметричным отражениям;

$R_C = \sum |E_h| / \sum |F_{PH} - F_P|$ – фактор расходимости Куллиса по центросимметричным отражениям;

F_P и F_{PH} – экспериментально наблюдаемые значения структурных амплитуд белка и производной;

E_h – величина ошибки замыкания фазового треугольника для одного отражения.

Полученный синтез Фурье электронной плотности не позволил, однако, достаточно хорошо определить границы молекулы. Существенное увеличение контраста синтеза получено за счет определения фаз низкочастотных структурных факторов в зоне от 120 до 30 Å. Фазы для этих отражений определены с помощью фильтрации синтеза Фурье, построенного по отражениям в диапазоне от 30 до 8 Å [14].

Проекция YZ синтеза Фурье электронной плотности для слоя кристалла толщиной в половину ячейки представлена на рис. 1. Молекула G-фактора состоит из двух глобул и имеет размеры около $90 \times 60 \times 40$ Å. В первой глобуле, область A, находится около 60% всей электронной плотности молекулы. Во второй глобуле, область B, распределено около 40% массы молекулы. Место посадки ртутного реагента показано на рисунке стрелкой. По всей вероятности, это место относится к той части молекулы, где расположен единственный Cys 71 [7], а значит, в соот-

ветствующей части глобулы А размещается каталитический ГТФ-связывающий домен G-фактора. Соответственно, можно предположить, что глобула А относится к N-концевой, а глобула В — к С-концевой частям G-фактора. Из распределения электронной плотности можно заключить, что глобула А более компактна по сравнению с глобулой В.

Авторы выражают благодарность В.В. Борисову за предоставление программы первичной обработки данных, Е.А. Вернословой, Ю.В. Сергееву и Н.А. Курочкиной за программы, использованные при анализе полученных результатов.

Институт белка Академии наук СССР
Пушино Московской обл.
Научно-исследовательский вычислительный центр
Академии наук СССР, Пушино, Московской обл.
Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова
Академии наук СССР, Москва

Поступило
27 V 1991

ЛИТЕРАТУРА

1. Спири́н А.С. Структура рибосом и биосинтез белка. М.: Высш. шк., 1986, с. 134, 148, 196–211.
2. Liljas A. The Ribosome: structure, function and evolution. Wash.: Amer. Soc. Microbiol., 1990, p. 309–317.
3. Jürnak F. — Science, 1985, vol. 230, p. 32–36.
4. Wooley P., Clark B.F.C. — Biotechnology, 1989, vol. 7, p. 913–920.
5. Bourne H.R., Sanders D.V., McCormick F. — Nature, 1990, vol. 348, p. 125–132.
6. Tong L., de Wos A.M., Milburn M.V. — J. Mol. Biol., 1991, vol. 217, p. 509–516.
7. Яхнин А.В., Ворожейкина Д.П., Матвиенко Н.И. — Биохимия, 1990, т. 55, с. 1539–1552.
8. Гарбер М.Б., Решетникова Л.С. — Биоорганическая химия, 1982, т. 8, с. 1572–1575.
9. Chirgadze Yu.N., Nikonov S.V., Brazhnikov E.V. et al. — J. Mol. Biol., 1983, vol. 168, p. 449–450.
10. Koeppe R.E., Stroud R.M., Pena V.A., Santi D.V. — Ibid., 1975, vol. 98, p. 155–160.
11. Некрасов Ю.В., Сосфенов Н.И. Методы структурного анализа. М.: Наука, 1989, с. 140–153.
12. North A., Phillips D., Matthews F. — Acta cryst., 1968, vol. A24, p. 351–359.
13. Matthews B.W., Czerwinski E.W. — Ibid., 1975, vol. A31, p. 480–485.
14. Urzhumtsev A.G. — Ibid., 1990, vol. A46, p. 114.