

## ЛИТЕРАТУРА

1. Jamieson J.D., Palade G.E. — J. Cell. Biol., 1964, vol. 23, p. 151–156.
2. DeBold A.J., Borenstein H.B., Veress A.T., Sonnenberg H. — Life Sci., 1981, vol. 28, p. 89–94.
3. Flynn T.G., deBold M.L., deBold A.J. — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1983, vol. 117, p. 859–865.
4. Okayama H., Berg P. — Molec. Cell Biol., 1982, vol. 2, p. 161–170.
5. Nakayama K., Ohkubo H., Hirose T. et al. — Nature, 1984, vol. 310, p. 699–701.
6. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. In: Molecular cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
7. Thomas P.S. — Methods in Enzymol., 1983, vol. 100, p. 255–266.
8. Opdenaker G., Billian A., Volkaert G., De Somer P. — Biochem. J., 1985, vol. 231, p. 309–313.
9. Alwine J.C., Kemp D.J., Stark G.R. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, vol. 74, № 12, p. 5350–5354.
10. Flynn T.G., Davies P.L. — Biochem. J., 1985, vol. 232, p. 313–321.
11. Lang R.E., Tholken H., Ganten D. et al. — Nature, 1985, vol. 314, p. 264–266.
12. Tanaka I., Misono K.S., Inagami T. — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1984, vol. 124, № 2, p. 663–668.
13. Larose P., Meloche S., du Souich P. et al. — Ibid., 1985, vol. 130, № 2, p. 553–558.
14. Arendt R.M., Stange E., Zahringer J. et al. — FEBS Lett., 1985, vol. 189, № 1, p. 57–61.
15. Sonnenberg H., Miloevic S., Veress A.T. — Hypertension, 1983, vol. 5, p. 672–675.

УДК 577.1:547.96 + 617.74

БИОХИМИЯ

Ю.Н. ЧИРГАДЗЕ, Н.А. НЕВСКАЯ, Н.П. ФОМЕНКОВА, С.В. НИКОНОВ,  
Ю.В. СЕРГЕЕВ, Е.В. БРАЖНИКОВ, М.Б. ГАРБЕР, В.Ю. ЛУНИН,  
А.Г. УРЖУМЦЕВ, Е.А. ВЕРНОСЛОВА

### ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ГАММА-КРИСТАЛЛИНА $\Pi\text{b}$ ИЗ ХРУСТАЛИКА ГЛАЗА ТЕЛЕНКА ПРИ РАЗРЕШЕНИИ 2,5 Å

(Представлено академиком А.С. Спириным 15 V 1986)

Кристаллины являются структурными водорастворимыми белками хрусталика глаза позвоночных. Самые низкомолекулярные из них — гамма-кристаллины. Это мономерные белки с молекулярным весом около 20 000 Д. Они гомологичны между собой, а также с бета-кристаллинами, образуя суперсемейство бета- и гамма-кристаллинов [1]. В отличие от других кристаллинов гамма-кристаллины имеют аномально высокое содержание цистеиновых остатков. В хрусталике глаза соотношение SH-групп и S—S-связей является характеристичным. Оно плавно меняется с возрастом и резко при патологии. Отсюда следует, что гамма-кристаллины играют важную роль в функционировании хрусталика глаза. В настоящее время методом к-ДНК определено 17 аминокислотных последовательностей гамма-кристаллинов позвоночных. Однако полная пространственная структура определена только для гамма-кристаллина II теленка при разрешении 1,9 Å [2]. Кроме этого, для гамма-кристаллина  $\Pi\text{b}$  теленка был получен ход главной цепи при разрешении 3,0 Å [3, 4]. В данной работе определена пространственная структура этого белка при разрешении 2,5 Å и представлены основные результаты по ее изучению.

Для определения структуры с более высоким разрешением потребовались более совершенные кристаллы. Такие кристаллы были нами получены заменой в маточном растворе белка [5] дитиотреитола на 5 мМ глутатиона в виде смеси восстановленной и окисленной форм в молярном отношении 10:1. Новые кристаллы, как и описанные ранее [3–5], принадлежали к пространственной группе  $P2_12_12_1$  и имели параметры элементарной ячейки 58,7 × 69,5 × 116,9 Å.

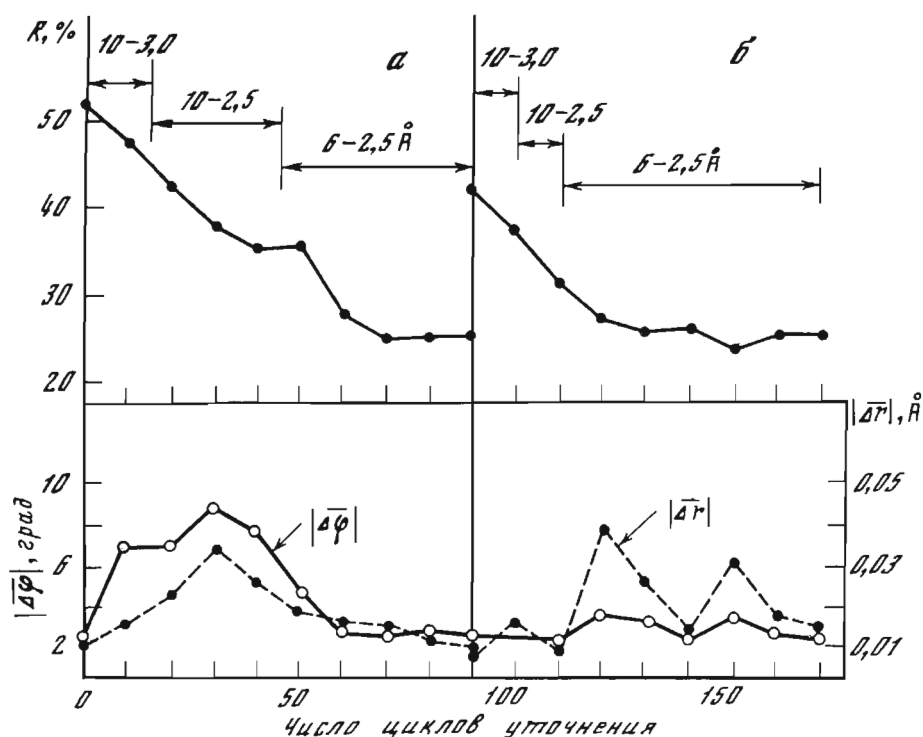


Рис. 1. Изменение кристаллографического R-фактора и средних отклонений от стандартных значений длин связей  $|\Delta r|$  и валентных углов  $|\Delta \varphi|$  в процессе уточнения. а, б – первый и второй этапы уточнения соответственно. Цифрами указаны зоны разрешения

Дифракционные данные с разрешением 2,5 Å были собраны с одного монокристалла нативного белка методом вращения. Обработка рентгенограмм была проведена с помощью программного комплекса, созданного К. Бартелсом и П. Швагером (ФРГ) и поставленного на ЭВМ ЕС-1040 Д. Васильевым. Набор содержал 13 326 отражений, среднее значение фактора расходимости по которым составило 6,9%. Фазы структурных факторов в зоне разрешения до 3,0 Å были получены ранее методом изоморфного замещения с использованием аномального рассеяния [3, 4]. Фазы отражений в области 3,0–2,7 Å были рассчитаны с помощью построения и модификации сначала "фиктивной" [6], а затем "смешанной" [7] моделей белка. Это дало возможность получить карты распределения электронной плотности с разрешением 2,7 Å, а по ним построить исходную для уточнения модель молекулы, содержащую 95% всех неводородных атомов. Построение белковой модели по картам электронной плотности проводили с помощью программы ISOCUB, использующей интерактивную машинную графику [8]. Ввиду отсутствия точной аминокислотной последовательности для гамма-кристаллина IIIб теленка использовали последовательность, выведенную нами на основе предварительных данных [9].

Кристаллографическое уточнение атомной модели гамма-кристаллина IIIб было проведено с помощью разработанной в Научно-исследовательском вычислительном центре АН СССР программы FROG, использующей алгоритм быстрого дифференцирования [10]. В процессе уточнения минимизировался функционал  $Q = Q_X + Q_S + Q_E$ , где  $Q_X$  – характеризует расхождение вычисленных и измеренных модулей структурных факторов  $F_{\text{выч}}$  и  $F_{\text{эксп}}$ ;  $Q_S$  – учитывает длины связей, валентные углы и другие геометрические параметры модели;  $Q_E$  – определяет энергию невалентных взаимодействий атомов. Один цикл уточнения требовал 20 мин процессорного времени ЭВМ ЕС-1055 М.

Геометрические параметры исходной модели в некоторых случаях существенно отличались от стандартных, поэтому перед уточнением было проведено 40 циклов

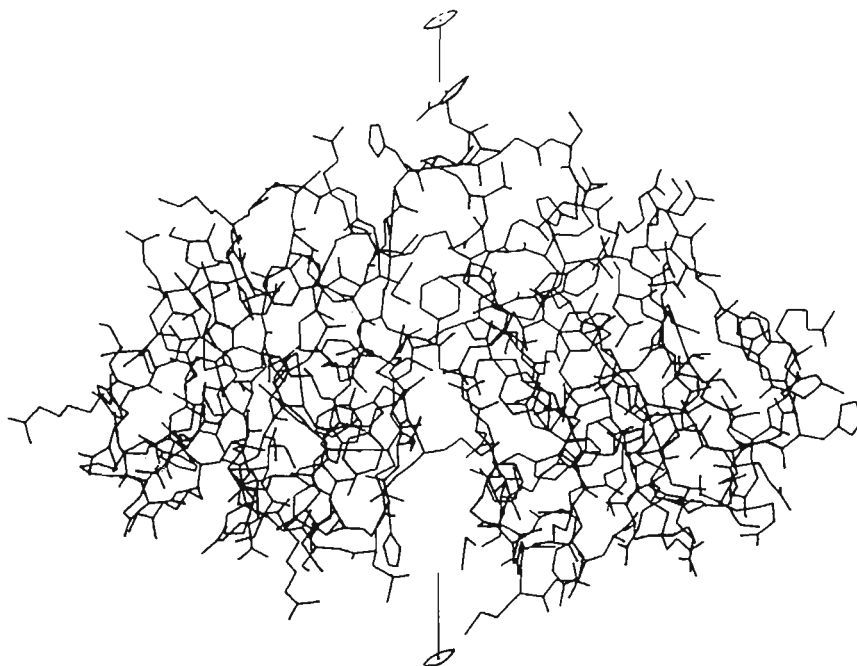


Рис. 2. Общий вид скелетной модели молекулы гамма-кристаллина IIIb теленка. Показана поворотная ось псевдосимметрии 2-го порядка, определяющая взаимное расположение доменов в молекуле

”регуляризации” модели. Для этого минимизировался функционал  $Q_S + Q_E$ . Отдельные наиболее сильные отклонения от идеальных параметров, не поддающиеся автоматической корректировке, были исправлены вручную. Кристаллографическое уточнение моделей обеих молекул, находящихся в независимой части элементарной ячейки, было проведено в два этапа. Ручная коррекция модели с использованием интерактивной машинной графики была осуществлена только между этапами. Карты электронной плотности, построенные на основе уточненной на первом этапе модели, содержали новую информацию, которая позволила дополнить модель частью недостающих боковых групп. В общей сложности проведено 170 циклов уточнения. Изменения кристаллографического R-фактора, а также средних отклонений геометрических параметров от стандартных представлены на рис. 1. Исходный R-фактор был равен 52% (зона 10–3,0 Å), конечный – 25% (зона 6–2,5 Å, 11 400 отражений). В процессе уточнения оказалось полезным попеременное ослабление и усиление требований, налагаемых на геометрические параметры, а также предложенная Агарвалом [11] отбраковка рефлексов по величине  $F_{\text{выч}}/F_{\text{эксп}}$ . Среднее отклонение координат атомов уточненной модели от соответствующей исходной составило на первом этапе 0,44 Å, а на втором 0,32 Å. Геометрические параметры окончательной модели имеют средние отклонения от стандартных значений: 0,016 Å для длин связей и 2,9° для валентных углов.

Обе молекулы независимой части элементарной ячейки имеют одинаковую конформацию и отличаются только расположением некоторых групп, находящихся на поверхности. Пространственная структура гамма-кристаллина IIIb (рис. 2) в целом очень близка к структуре гамма-кристаллина II [2]. Молекулы этих белков имеют исключительно высокую симметрию. Они состоят из двух практически одинаковых глобулярных доменов. Каждый домен образован двумя подобными структурными мотивами, ход цепи в которых подчиняется топологии простого греческого ключа. Гидрофобные ядра доменов и область междоменного контакта образованы консервативными остатками и имеют очень похожую структуру в обоих гамма-

кристаллинах тельца. Междоменная область состоит из гидрофобного ядра и гидрофильной оболочки, которая отделяет это ядро от влияния растворителя. Поверхность молекулы характеризуется наличием на ней четырех крупных кластеров заряженных групп. Это является, по-видимому, особым свойством гамма-кристаллинов, которые должны удерживать воду в хрусталике глаза позвоночных.

Степень гомологии аминокислотных последовательностей рассматриваемых гамма-кристаллинов составляет 84%. Практически все замены (22 из 25) сосредоточены в С-доме, причем 15 замен имеют место в третьем мотиве. Почти все эти замены являются консервативными по свойствам гидрофобности или гидрофильности. В тех нескольких случаях, когда гидрофобный остаток меняется на гидрофильный или наоборот, остатки находятся на поверхности молекулы. Следовательно, такие замены не должны существенно менять ее пространственную структуру, но могут влиять на важные свойства белка. Так, в гамма-кристаллинах тельца имеется область выхода на поверхность гидрофобных остатков. Замена одного из этих остатков 103 Met на гидрофильный Ser, которая имеет место в гамма-кристаллине II, приводит к исчезновению межмолекулярного контакта в этой области, что может быть причиной различия кристаллических упаковок. Мы не обнаружили пока каких-либо существенных различий в конформации или взаимном расположении боковых групп функционально важных цистеиновых остатков в гамма-кристаллинах тельца. Для выяснения этого вопроса требуется определение структуры при более высоком разрешении.

Авторы выражают признательность проф. Т. Бланделлу (Биркбек колледж, Лондонский университет) за интерес к работе и предоставление данных по пространственной структуре гамма-кристаллина II, Э.Э. Шнолю (Научно-исследовательский вычислительный центр АН СССР, Пушкино) за поддержку и помощь при выполнении вычислительной части работы и Д.Г. Васильеву (Институт молекулярной биологии АН СССР) за помощь при обработке дифракционных данных.

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

Поступило  
28 V 1986

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Piatigorsky J. — Cell, 1984, vol. 38, p. 620–621.
2. Wistow G., Turnell B., Summers L. et al. — J. Mol. Biol., 1983, vol. 170, p. 175–202.
3. Чиргадзе Ю.Н., Сергеев Ю.В., Фоменкова Н.П. и др. — ДАН, 1981, т. 259, с. 1502–1505.
4. Chirgadze Yu.N., Sergeev Yu.V., Fomenkova N.P., Oreshin V.D. — FEBS Lett., 1981, vol. 131, p. 81–84.
5. Chirgadze Yu.N., Oreshin V.D., Sergeev Yu.V. et al. — Ibid., 1980, vol. 118, p. 296–298.
6. Lunin V.Yu., Urzhumtzev A.G. — Acta cryst., 1984, vol. A40, p. 269–277.
7. Lunin Yu.V., Urzhumtzev A.G., Vernoslova E.A. et al. — Ibid., 1985, vol. A41, p. 166–171.
8. Невская Н.А., Курочкина Н.А., Чиргадзе Ю.Н. — Кристаллография, 1986, т. 31, с. 303–311.
9. Croft L.R., Slingsby C. In: The human lens — in relation to cataract. Ciba Found. Symp., 1973, vol. 19, p. 212–213.
10. Lunin V.Yu., Urzhumtzev A.G. — Acta cryst., 1985, vol. A41, p. 327–333.
11. Agarwal R.C. — Ibid., 1978, vol. A34, p. 791–809.