

Член-корреспондент АН СССР Б. К. ВАЙНШТЕЙН, С. Я. КАРПУХИНА,  
Н. И. СОСФЕНОВ, Л. А. ФЕЙГИН

### ПОСТРОЕНИЕ МОДЕЛИ КАТАЛАЗЫ ПО ДАННЫМ РЕНТГЕНОВСКОГО МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ

Каталаза — фермент (молекулярный вес около 250 000), катализирующий разложение перекиси водорода на воду и кислород, встречается во многих органах и тканях высших животных. В последнее время структура кристаллической каталазы систематически исследовалась одним из авторов с сотрудниками (1–5) с помощью электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа. В настоящей работе для изучения четвертичной структуры каталазы был применен метод рентгеновского малоуглового рассеяния,

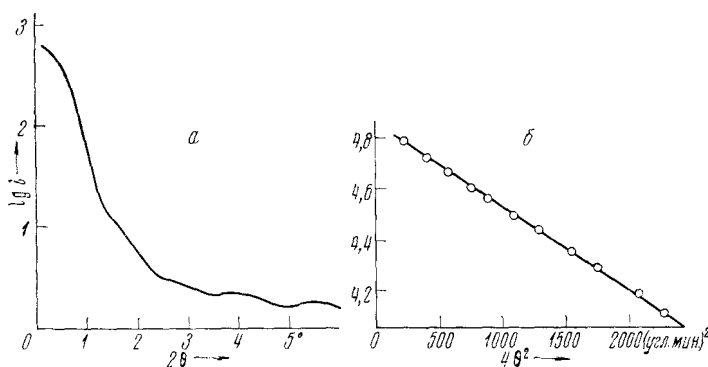


Рис. 1. Экспериментальная кривая рентгеновского малоуглового рассеяния раствором каталазы до введения коллимационной поправки (а) и начальная часть кривой рассеяния раствором каталазы после введения коллимационной поправки (б)

позволяющий получить ряд сведений о строении молекул, находящихся в растворе. Первые данные о молекулах каталазы с помощью этого метода были получены еще в 1957 г. Малмоном (6), определившим радиус инерции молекулы и величину ее анизотрии.

Препараты каталазы приготавливались следующим образом. Печень только что забитого крупного рогатого скота гомогенизируется, после чего белок экстрагируется водой и фракционируется ацетоном. Затем каталаза отделяется и очищается шестикратной перекристаллизацией и осаждением белка из водного раствора сульфатом аммония (7, 8); чистота препаратов контролировалась с помощью суперцентрифуги Спинко Е. Таким образом были получены растворы каталазы с концентрацией 20–30 мг/мл при pH 7,2–7,4. Была также разработана методика получения растворов каталазы с концентрацией 100 мг/мл. Концентрация растворов определялась спектрофотометрически. Исследуемые растворы для рентгеновской съемки помещались в кюветы с окнами из пленки полиэтилентерефталата.

Измерение рентгеновского малоуглового рассеяния растворами каталазы проводилось нами на автоматическом малоугловом дифрактометре АМУР-1 (9). В работе использовалась рентгеновская трубка БСВ-11 с медным антикатодом; режим трубки 30 кв, 27 ма. Регистрация интенсивности велась с помощью сцинтилляционного детектора. Излучение монохроматизировалось с помощью амплитудного дискриминатора и применялся никелевый  $\beta$ -фильтр.

Полная кривая рассеяния раствором каталазы, исследованная нами до угла рассеяния  $6^\circ$ , была в процессе измерений условно разбита на два участка. Первый участок — от  $3'$  до  $1^\circ$ , где интенсивность падает примерно на два порядка, второй — от  $0,8^\circ$  до  $6^\circ$ , где интенсивность падает медленнее. В первом случае измерения велись при узких коллимационных щелях и малой концентрации растворов каталазы (5–20 мг белка на 1 мл раствора), во втором — при широких щелях и высокой концентрации (до 100 мг/мл) для увеличения интенсивности рассеяния. При самых малых углах учитывался концентрационный эффект и кривые рассеяния экстраполировались к нулевой концентрации. Кривые рассеяния на двух участках «сшивались» в единую кривую, в которую вносилась коллимационная поправка в соответствии с конечной высотой щелей<sup>(10)</sup>. Итоговая единая кривая интенсивности приведена на рис. 1а. Интенсивность при наибольших измеренных углах падает более, чем на три порядка по сравнению с рассеянием в нулевой угол. Для углов, меньших одного градуса, была построена зависимость  $\lg i(4\theta^2)$  (рис. 1б); прямолинейный участок вблизи начала координат подтверждает достаточно высокую однородность препарата. По тангенсу угла наклона прямой был найден радиус инерции молекулы  $R_g$ , оказавшийся равным  $39,8 \pm 0,3$  Å. По суммарной энергии рассеяния во всем обратном пространстве определен объем молекулы:  $320\,000 \pm 15\,000$  Å<sup>3</sup>, что хорошо совпадает с данными<sup>(9)</sup>. Эти два рентгеновских инварианта могут уже много дать при поиске формы молекулы<sup>(11)</sup>.

В упоминавшейся работе<sup>(6)</sup> при интерпретации экспериментальных данных была предпринята попытка аппроксимировать молекулу каталазы простейшими выпуклыми фигурами — эллипсоидами и цилиндрами (для которых известны кривые рассеяния), что не привело к успеху. Кривые для всех таких выпуклых фигур с некоторого угла начинали резко расходиться с экспериментом. Кроме того, аппроксимация выпуклыми фигурами приводила к весьма вытянутой модели, что противоречит малой величине анизотрии молекулы  $\sim 1,5$ , определенной из кривой рентгеновского малоуглового рассеяния.

Существующие данные о четвертичной структуре белков и развитие теории рассеяния и техники расчетов позволяют интерпретировать кривые малоуглового рассеяния более точно, не ограничиваясь рассмотрением только простейших геометрических моделей типа эллипсоида, цилиндра, а рассматривая тела, вообще говоря, произвольной формы, но, разумеется, удовлетворяющие экспериментально определенным рентгеновским мало-

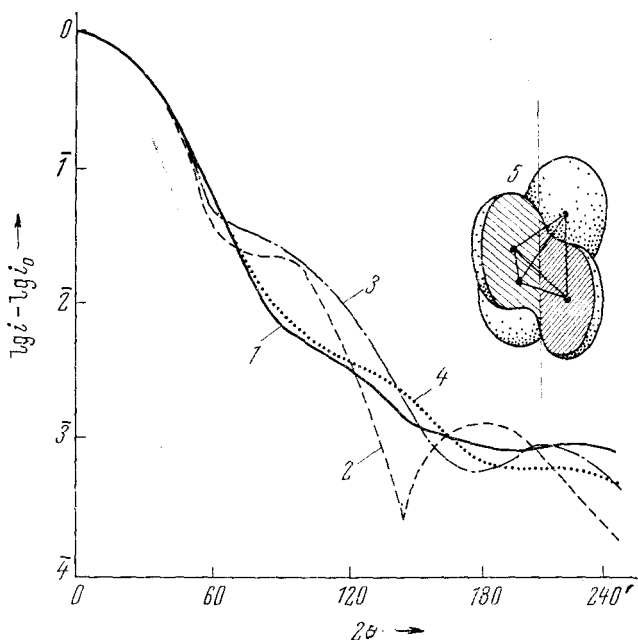


Рис. 2. Сравнение рассчитанных кривых рассеяния для моделей с экспериментальной кривой: 1 — эксперимент, 2 — модель из четырех шаров, 3 — из четырех эллипсоидов, 4 — оптимальная модель, 5 — схема модели 4

угловым инвариантам — объему, радиусу инерции, анизометрии. При этом прежде всего можно отказаться от условия выпуклости аппроксимирующей фигуры.

Такая модель может быть описана как тело с постоянной электронной плотностью

$$\rho(r) = \begin{cases} 1 & \text{внутри } S(r), \\ 0 & \text{вне } S(r), \end{cases} \quad (1)$$

где  $S(r)$  — граничная поверхность. Она описывает и внутренние поверхности, если они есть. Интенсивность рассеяния определяется трансформантой самосвертки

$$I(s) = \mathfrak{F}[\tilde{\rho}(r)], \quad (2a)$$

где

$$\tilde{\rho}(r) = \int \rho(r') \rho(r - r') dv_{r'}. \quad (2b)$$

Функция расстояний между элементами объема объекта, заключенными внутри  $S(r)$ .

В малоугловом рассеянии  $I(s)$  усредняется по всем пространственным ориентациям, что и дает после исключения инструментальных поправок наблюдаемую интенсивность

$$i(s) = \overline{I(s)}. \quad (3)$$

Задавая любые  $\rho(r)$ , можно, таким образом, сравнивать наблюдаемые и рассчитанные  $i(s)$ :

$$R(s_1) = \quad (4)$$

$$= \int_0^{s_1} |i_M(s) - i_0(s)|^2 s^2 ds / \int_0^{s_1} i_0(s) s^2 ds.$$

При этом элементы объема внутри  $S(r)$ , определяющие  $\tilde{\rho}(r)$ , выбирают некоторым подходящим образом. Выражение (3), как известно, может быть представлено в виде суммы <sup>(12)</sup>

$$i(s) = \sum_i \sum_k F_i F_k \frac{\sin sr_{ik}}{sr_{ik}}, \quad (5)$$

где  $r_{ik}$  — расстояния между элементами объема модели внутри ее поверхности  $S(r)$ ;  $F_i, F_k$  — амплитуды рассеяния.

Практически для построения модели можно использовать данные о форме и положении вторичных максимумов  $i(s)$ . В данной работе мы использовали именно этот метод и соотношение (4) для проверки пробных вариантов.

Положения вторичных максимумов близки к абсциссам максимумов для рассеивающих центров, находящихся на расстоянии 55 Å. По ряду данных <sup>(1, 14)</sup> в молекуле каталазы имеются четыре субъединицы. Поэтому простейшая модель была выбрана в виде четырех соприкасающихся шаров, расположенных в вершинах правильного тетраэдра с ребром 55 Å. Эта модель обладает радиусом инерции 39,7 Å и объемом 325 000 Å<sup>3</sup>.

Кривая малоуглового рассеяния этой моделью (рис. 2, 2), рассчитанная по методике, изложенной в <sup>(15)</sup>, хорошо передает некоторые особенности экспериментальной кривой, особенно ее начало (примерно до 1°), а затем существенно с ней расходится.

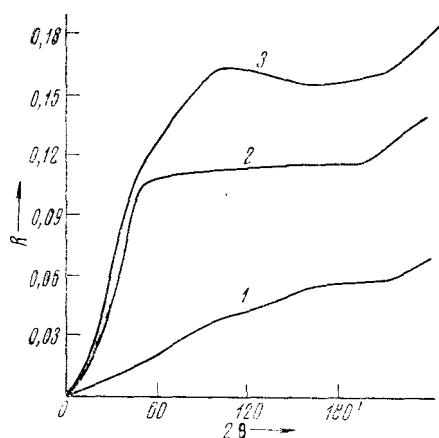


Рис. 3. Функция расходимости  $R(2\theta)$  для различных моделей. 1 — модель по данным кривой 4 (рис. 2), 2 — рентгеноструктурный анализ монокристаллов <sup>(3)</sup>, 3 — электронная микроскопия <sup>(4)</sup>

Следующей явилась модель из четырех соприкасающихся вытянутых эллипсоидов с центрами в вершинах того же правильного тетраэдра с сохранением величин радиуса инерции и объема. Кривая рассеяния этой моделью (рис. 2, 3) лучше соответствует эксперименту, чем модель четырех шаров. Однако первый побочный максимум выражен много четче, чем на экспериментальной кривой. Попытки изменить ситуацию варьированием размеров эллипсоидов и некоторым искажением тетраэдра не привели к заметному улучшению.

Следующей ступенью было заполнение полости между тетраэдрически расположенными эллипсоидами, аппроксимирующими субъединицы, с сохранением внешней общей поверхности  $S(r)$ . Это сразу улучшило совпадение модельной кривой с экспериментом. Наилучшей оказалась модель, схематически изображенная на рис. 2, 5. Эта модель построена следующим образом. Четыре одинаковых эллипсоида вращения ( $a = b = 17 \text{ \AA}$ ,  $c = 47 \text{ \AA}$ ) размещены в вершинах тетраэдра с ребром, равным  $59 \text{ \AA}$ , так что длинные оси параллельны друг другу. Пятый эллипсоид — также вытянутый эллипсоид вращения ( $a = b = 30 \text{ \AA}$ ,  $c = 50 \text{ \AA}$ ), центр которого расположен в центре тетраэдра (ось  $c$  параллельна оси  $c$  малых эллипсоидов) — объединяет всю фигуру в целом, выделяя все же четыре субъединицы.

На рис. 3 приведена функция расходимости  $R(s)$ , построенная для наилучшей модели. Для сравнения там же приведены значения  $R$ , вычисленные для четвертичной структуры каталазы, найденной по данным рентгеноструктурного анализа монокристаллов <sup>(5)</sup> и электронной микроскопии <sup>(4)</sup>. Для этих двух случаев функции строились следующим образом. По данным о форме молекулы каталазы вычислялась функция интенсивности рентгеновского малоуглового рассеяния, которая по приведенной выше формуле сравнивалась с экспериментальной кривой рассеяния, полученной в настоящей работе.

Совпадение кривых, рассчитанных для указанных трех моделей, с экспериментальными данными вплоть до углов  $\sim 200'$  вполне удовлетворительное. Общая малая величина  $R$  для модели, предложенной на основе анализа особенностей малоуглового рассеяния, говорит, что она отражает основные черты четвертичной структуры каталазы. Вместе с тем более пологий ход функции  $R$  в интервале  $60' \leq 2\theta \leq 180'$  для строения молекулы каталазы, определенного по рентгеновским данным для монокристаллов, свидетельствует о лучшей передаче деталей этим методом.

Несомненно, что полученная экспериментальная кривая рассеяния для каталазы позволяет в принципе уточнить строение каталазы, если удастся добиться минимизации  $R$ -фактора в более широком интервале углов.

Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
5 IX 1972

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Б. К. Вайнштейн, Н. А. Киселев, В. Л. Шпицберг, ДАН, 167, № 1, 212 (1966).
- <sup>2</sup> Е. К. Вайнштейн, В. В. Барынин и др., Кристаллография, 12, № 5, 860 (1967).
- <sup>3</sup> Б. К. Вайнштейн, В. В. Барынин, Г. В. Гурская, ДАН, 182, № 3, 569 (1968).
- <sup>4</sup> В. В. Барынин, Б. К. Вайнштейн, Кристаллография, 16, № 4, 751 (1971).
- <sup>5</sup> Г. В. Гурская, Г. М. Лобанова, Б. К. Вайнштейн, Кристаллография, 16, № 4, 764 (1971).
- <sup>6</sup> A. G. Malmgren, Biochim. et biophys. acta, 26, 233 (1957).
- <sup>7</sup> H. Tauber, E. L. Petit, J. Biol. Chem., 195, № 2, 703 (1952).
- <sup>8</sup> Г. В. Гурская, С. Я. Карпукшина, Г. М. Лобанова, Биофизика, 16, № 3, 553 (1971).
- <sup>9</sup> Н. И. Сосфенов и др., Аппаратура и методы рентгеновского анализа, 5, 53 (1969).
- <sup>10</sup> Б. М. Щедрин, Л. А. Фейгин, Кристаллография, 11, № 2, 159 (1966).
- <sup>11</sup> Л. А. Фейгин, Кристаллография, 16, № 4, 711 (1971).
- <sup>12</sup> Р. Джеймс, Оптические принципы дифракции рентгеновских лучей, М., 1950.
- <sup>13</sup> Б. К. Вайнштейн, Дифракция рентгеновых лучей на цепных молекулах, Изд. АН СССР, 1963.
- <sup>14</sup> В. Л. Шпицберг, Биофизика, 11, 766 (1966).
- <sup>15</sup> Ю. А. Рольбин, Л. А. Фейгин, Б. М. Щедрин, Аппаратура и методы рентгеновского анализа, 9, 46 (1971).