

Б. А. ФЕДОРОВ

**ИЗУЧЕНИЕ ТРЕТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ВЫСОКОСПИРАЛЬНЫХ  
БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ РЕНТГЕНОВСКОГО ДИФFUЗНОГО  
РАСSEЯНИЯ**

(Представлено академиком А. С. Спириным 19 IX 1974)

Диффузное рассеяние рентгеновских лучей — прямой аналог рентгено-структурного анализа для неориентированных макромолекул — широко используется при изучении структуры белков в растворе. Исследования последних лет показали, что на индикатрисах рассеяния глобулярными белками имеется определенная область углов рассеяния (соответствующая брэгговским расстояниям  $\sim 10-20 \text{ \AA}$ ), которая хорошо доступна экспериментально (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>), чувствительна к внутримолекулярной упаковке полипептидной цепи (<sup>3</sup>) и поддается строгому количественному описанию при корректном учете влияния растворителя (<sup>4</sup>).

Наличие указанных предпосылок позволяет перейти к решению важной задачи — разработке практических методов изучения третичной структуры белков на основе их кривых диффузного рассеяния. При этом необходимо отказаться от рассмотрения структуры на атомарном уровне и пойти по пути описания отдельных участков полипептидной цепи в терминах единого «блока», адекватного (в смысле рентгеновского рассеяния) реальной цепи. Моделируя глобулярный белок системой таких блоков и сравнивая ее интенсивность рассеяния с экспериментальной, можно добиться «наилучшего» (т. е. отвечающего реальной третичной структуре) расположения блоков друг относительно друга.

В настоящей работе в качестве такого «блочного» элемента выбран спиральный участок полипептидной цепи, который, как можно показать, в интересующей нас области углов рассеяния хорошо описывается ограниченным аксиально симметричным цилиндром с амплитудой рассеяния

$$A(\mu) = 2\pi \int_0^{\infty} (\rho(r) - \rho_0) J_0(\sqrt{\mu_x^2 + \mu_y^2} r) r dr \frac{2 \sin(\mu_z L/2)}{\mu_z} =$$

$$= (m - \pi R_0^2 \rho_0) \left( 1 + \sum_{k=1}^{\infty} \frac{(-1)^k R_k^{2k}}{2^{2k} (k!)^2} (\mu_x^2 + \mu_y^2)^k \right) \frac{2 \sin(\mu_z L/2)}{\mu_z}. \quad (1)$$

Здесь  $\mu = (\mu_x, \mu_y, \mu_z)$  — вектор обратного пространства,  $(u = |\mu| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta,$

$\lambda$  — длина волны рентгеновских лучей,  $2\theta$  — угол рассеяния),  $J_0(x)$  — функция Бесселя нулевого порядка,  $\rho_0$  — электронная плотность растворителя,  $m$ ,  $L$  и  $R_0$  — соответственно линейная электронная плотность, длина и диаметр цилиндра, обладающего радиальным распределением электронной плотности  $\rho(r)$  и ориентированного вдоль оси  $z$ , а

$$R_k^{2k} = \frac{\bar{R}_k^{2k} - \pi R_0^{2(k+1)} \rho_0 / m (k+1)}{1 - \pi R_0^2 \rho_0 / m}. \quad (2)$$

Величины  $\bar{R}_k$ , определяемые по формуле

$$\bar{R}_k^{2k} = 2\pi \int_0^\infty \rho(r) r^{2k+1} dr / 2\pi \int_0^\infty \rho(r) r dr, \quad (3)$$

являются аналогом радиуса инерции поперечного сечения цилиндра ( $k=1$ ) для случая моментов более высокого порядка ( $k>1$ ). Тот же смысл имеют величины  $R_k$  (формула (2)), если цилиндр находится не в вакууме, но погружен в однородный растворитель  $\rho_0$ . В области углов рассеяния

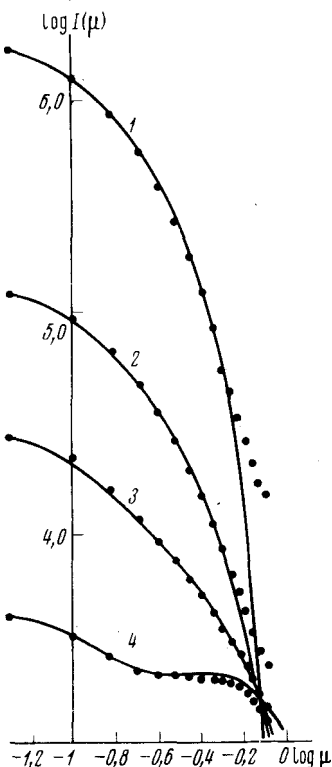


Рис. 1

Рис. 1. Теоретические кривые рассеяния спиралью  $H$  из  $Mб$ , рассчитанные по координатам атомов (кружки), в сравнении с кривыми рассеяния цилиндрической моделью этой спирали (линии). Электронные плотности растворителя: 1 —  $\rho_0=0$  («вакуумная» кривая); 2 —  $\rho_0=0,33$  эл/Å<sup>3</sup>; 3 —  $\rho_0=0,40$  эл/Å<sup>3</sup>; 4 —  $\rho_0=0,43$  эл/Å<sup>3</sup>

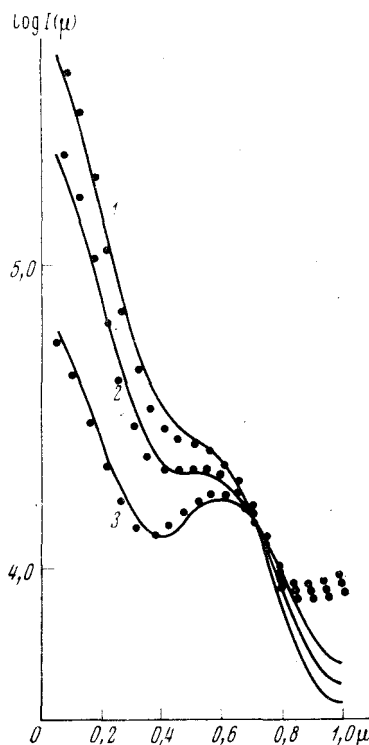


Рис. 2

Рис. 2. Теоретические кривые рассеяния «шпилькой»  $GH$  из  $Mб$ , рассчитанные по координатам атомов (кружки), в сравнении с кривыми рассеяния от системы двух цилиндров, моделирующих спирали  $G$  и  $H$  (линии). Электронные плотности растворителя: 1 —  $\rho_0=0,33$  эл/Å<sup>3</sup>; 2 —  $\rho_0=0,37$  эл/Å<sup>3</sup>; 3 —  $\rho_0=0,41$  эл/Å<sup>3</sup>

$\mu < 0,8-0,9$ , где индикатриса рассеяния чувствительна к внутримолекулярной упаковке, можно ограничиться точным описанием лишь двух членов в сумме (1), а остальные определять из модели однородного цилиндра, имеющего такой же  $\bar{R}_2$ .

Для нахождения амплитуды рассеяния от системы цилиндров, моделирующих  $N$  спиральных участков, необходимо задать координаты концов всех спиралей, путем преобразования координат (трансляции и вращения) каждой  $j$ -й спирали совместить ее ось с осью  $z$ , рассчитать  $A_j(\mu)$  и найти  $A(\mu)$  по формуле

$$A(\mu) = \sum_{j=1}^N A_j(\mu) \cos(\mu r_{j0}) + i \sum_{j=1}^N A_j(\mu) \sin(\mu r_{j0}), \quad (4)$$

где  $r_{j0}$  соединяет начало координат со средней точкой оси  $j$ -й спирали. Переход от амплитуды рассеяния  $A(\mu)$  к интенсивности диффузного рассеяния  $I(\mu)$  осуществляется методом «вращения» в обратном пространстве, подобно разработанным ранее (4).

Итак, для расчета амплитуды рассеяния цилиндра, моделирующего спиральный участок, необходимо знать величины  $m$ ,  $L$ ,  $R_0$ ,  $\bar{R}_1$  и  $\bar{R}_2$ . Если первые две легко оценить из аминокислотного состава и числа остатков спирального участка, то для определения остальных рассмотрим кривую рассеяния спиралью  $H$  из миоглобина кашалота (Mb), рассчитанную по координатам всех ее атомов с учетом влияния растворителя (4) (рис. 1, кружки). Из совпадения «вакуумной» кривой рассеяния спиралью  $H$  со «стандартной» кривой рассеяния бесконечным цилиндром можно определить  $\bar{R}_1$ , а из наклона прямолинейного участка зависимости  $\sqrt{I(\mu) \cdot \mu} / (\sqrt{I(\mu) \cdot \mu})_{\mu \rightarrow 0} + \bar{R}_1^2 \mu^2 / 4$  от  $\mu^2$  — величину  $\bar{R}_2$ . Диаметр цилиндра  $R_0$  может быть рассчитан из прямолинейной зависимости  $(\bar{R}_1^2 - R_1^2) / \rho_0$  от  $R_1^2$ , получаемой с помощью перегруппировки выражения (2) ( $k=1$ ). При этом необходимо предварительно (с помощью «стандартной» кривой) определить по кривым рис. 1 (кружки)  $R_1^2$  как функцию  $\rho_0$ .

Полученные таким образом для спирали  $H$  параметры  $R_0$ ,  $R_1$  и  $\bar{R}_2$  были использованы при расчете интенсивности рассеяния цилиндром по формулам (1)–(2) (рис. 1, линии). Как видно, имеет место хорошее согласие между точным и модельным расчетом в случае спирали  $H$  при всех рассмотренных  $\rho_0$ . Переход от параметров спирали  $H$  к соответствующим параметрам любой другой спирали  $j$  с электронной линейной плотностью  $m_j = m + \Delta m_j$  может быть проведен по приближенным формулам

$$R_{1j}^2 = \frac{m R_1^2 + \Delta m_j R_0^2}{m_j}, \quad R_{2j}^2 = \frac{m R_2^2 + \Delta m_j R_0^2}{m_j}, \quad R_{0j}^2 = R_0^2 + \frac{\Delta m_j}{\pi \rho_p}, \quad (5)$$

где  $\rho_p$  — средняя электронная плотность боковых цепей в спирали  $H$ . Было показано, что параметры, полученные с помощью формул (5), обеспечивают хорошее совпадение между точной и модельной кривыми рассеяния для спиралей  $G$  и  $E$  из Mb.

Для проверки развитого подхода к описанию системы из двух спиралей

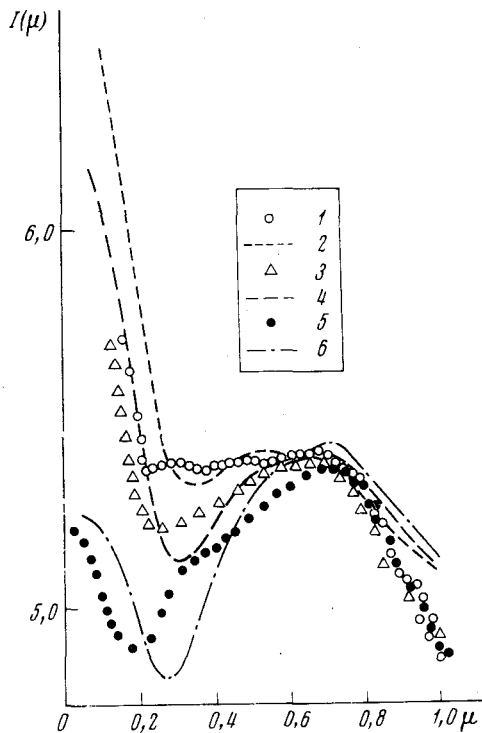


Рис. 3. Теоретические кривые рассеяния от системы 8 цилиндров, моделирующих молекулу Mb, в сравнении с экспериментальными кривыми рассеяния Mg (5). Электронные плотности растворителя:  $\rho_0 = 0,33$  эл/Å<sup>3</sup> (1, 2);  $\rho_0 = 0,37$  эл/Å<sup>3</sup> (3, 4);  $\rho_0 = 0,41$  эл/Å<sup>3</sup> (5, 6). 1, 3, 5 — эксперимент, 2, 4, 6 — теория

были рассчитаны точки (рис. 2, кружки) и на основе цилиндрической модели (рис. 2, линии) кривые рассеяния от «пшпильки» *GH* из Мб. На рис. 2 отчетливо виден «эффект упаковки» спиралей — наличие плеча (и даже минимума), отсутствующего на индикатрисах рассеяния отдельно спиральями *H* и *G*. Наконец, для оценки применимости развитого «блочного» метода к описанию структуры реальных белков были рассчитаны кривые рассеяния от системы цилиндров, моделирующих все 8 спиралей Мб. Учет неспиральных областей Мб (которые составляют ~25%) проводился путем соответствующего увеличения  $m_s$ ,  $R_{0j}$ , а также увеличения средней плотности боковых цепей во всех спиральных, приводящего к росту величин  $R_{1j}$  и  $R_{2j}$ . Результаты расчета в сравнении с экспериментальными кривыми<sup>(5)</sup> представлены на рис. 3. Как видно, теоретические кривые описывают основные особенности экспериментальных индикатрис рассеяния: плато для водного растворителя, максимум и все углубляющийся минимум для случая растворителей более высокой плотности.

Таким образом, предлагаемый «блочный» подход уже в настоящем варианте оказывается весьма полезным для изучения третичной структуры высокоспиральных белков, хотя, естественно, его расширение на область менее спиральных белков требует анализа также других «блоков» полипептидной цепи белка.

Институт белка  
Академии наук СССР  
Пуццино-на-Оке

Поступило  
8 IX 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> V. W. Arndt, D. P. Riley, Proc. Roy. Soc., v. A247, 409 (1955). <sup>2</sup> G. H. Echols, J. W. Anderegg, J. Am. Chem. Soc., v. 82, 5085 (1960). <sup>3</sup> А. И. Григорьев, Л. А. Волкова, О. Б. Пуццын, Молек. биол., т. 5, 661 (1973). <sup>4</sup> В. А. Fedorov, L. A. Voronin, O. B. Ptitsyn, FEBS Letters, v. 28, 188 (1972). <sup>5</sup> H. B. Stuhmann, Zs. phys. Chem. (Neue Folge), B. 72, 185 (1970).