

РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ НОВЫХ МЕТОДОВ И АППАРАТУРЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ МОНОКРИСТАЛЛОВ БЕЛКОВ В КООРДИНАТНЫХ РЕНТГЕНОВСКИХ ДИФРАКТОМЕТРАХ НА ОСНОВЕ ДВУМЕРНЫХ ПРОПОРЦИОНАЛЬНЫХ КАМЕР

М.Е.Андрианова*, Ю.В.Заневский, А.Б.Иванов, С.А.Мовчан, В.Д.Пешехонов, А.Н.Попов*, С.П.Черненко, Д.М.Хейкер*

Представлены результаты рентгеноструктурных исследований белковых монокристаллов с помощью дифрактометра КАРД-3 и КАРД-4, созданных на основе двумерных рентгеновских детекторов. Получено около 70 полных наборов интенсивностей отражений с высоким разрешением для различных белков. Эти данные позволили определить пространственную структуру целого ряда белков, представляющих большой научный и практический интерес. Приведены основные параметры новых разрабатываемых рентгеновских детекторов.

Работа выполнена в Лаборатории высоких энергий и Институте кристаллографии АН СССР.

The Development and Application of New Methods and Apparatus for the Study of Protein with the Aid of X-Ray Diffractometers Based on MWPCs

M.E.Andrianova et al.

The results of studies of X-ray protein single-crystals by using KARD-3 and KARD-4 diffractometers with two-dimensional X-ray detectors are presented. Integral intensities of about 70 protein crystals have been measured with a high resolution. These data make it possible to reconstruct the three-dimensional structure of a series of proteins. The parameters of new X-ray imaging detectors under construction are also presented.

The investigation has been performed at the Laboratory of High Energies, JINR and at the Institute of Crystallography, USSR Academy of Sciences.

Разработка и применение методов параллельной регистрации дифракционной картины в координатных дифрактометрах КАРД-3 и КАРД-4, основанных на двумерной пропорциональной

* Институт кристаллографии АН СССР им. А.В.Шубникова, Москва

камере с быстрыми линиями задержки (число разрешаемых элементов 256x265), позволяют сочетать преимущества счетчиков фотонов с двумерным свойством фотографической пленки^{/1/}. Скорость измерений в указанных дифрактометрах в ~50 раз выше, чем в современном одноканальном дифрактометре, что позволило за короткий срок получить полные наборы интенсивностей отражений от 37 монокристаллов^{/2/}. При параллельных измерениях сокращается время измерений и в том же отношении уменьшается доза облучения исследуемого образца, что открывает возможность исследований радиационно-нестойких белковых монокристаллов.

В 1986 и 1987 гг. с помощью дифрактометра КАРД-4 получены полные наборы интенсивностей отражений еще от 30 монокристаллов (см.табл.). Были получены наборы интегральных интенсивностей от кристалла вируса SM_1V (молекулярный вес 7800000, $a = 480 \text{ \AA}$) с разрешением 6 \AA ; каталазы ML и трех ее производных (молекулярный вес 180000, $a = 106, 6 \text{ \AA}$) с разрешением $2,5 \text{ \AA}$; формиатдегидрогеназы (холофермент) и 6 производных (молекулярный вес 80000, $a = 116 \text{ \AA}$) с разрешением 3 \AA ; терминазы, рибонуклеазы, леггемоглобина с разрешением $1,5 \div 1,7 \text{ \AA}$; Sto -репрессора с ДНК; трансаминазы, лейцинаминопептидазы, пирофосфатазы, лейцин-специфичного белка и их комплексов.

На основании анализа экспериментальных данных, полученных в координатных дифрактометрах КАРД-3 и КАРД-4, в лаборатории структуры белков Института кристаллографии АН СССР была определена пространственная структура термостабильного белка термитазы^{/3/}, сложного фермента T -каталазы с молекулярным весом 210000 и параметром кубической ячейки $a = 133,4 \text{ \AA}$ ^{/4/}, исследован пространственный механизм функционирования аминотрансферазы^{/5/}, проведено рентгеноструктурное исследование формиатдегидрогеназы^{/6/}. Установлена пространственная структура и исследован механизм функционирования ряда других ферментов, получены данные о пространственной структуре SM_1V -вируса.

В 1987 г. в Институте кристаллографии АН СССР совместно с Лабораторией высоких энергий ОИЯИ создан новый рентгеновский дифрактометр КАРД-5, предназначенный для исследований структуры белков с большим молекулярным весом, в основу которого вошел рентгеновский детектор с чувствительной площадью $460 \times 460 \text{ мм}$ ^{/7/}. Увеличение площади пропорциональной камеры при сохранении ее прежней толщины позволяет уменьшить параллакс. Хотя размеры этого детектора существенно увеличены (по сравнению с детектором в дифрактометре КАРД-4), повышено быстродействие линий задержки, что позволило сохранить величину мертвого времени на прежнем

Таблица

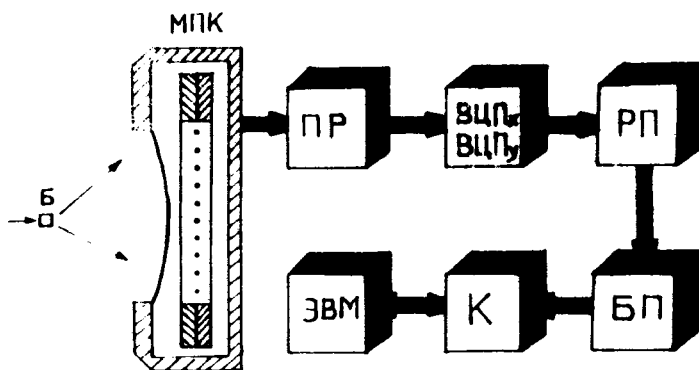
Результаты съемки монокристаллов белков
в дифрактометре КАРД-4 в 1986, 1987 г.г.

Образец	Молекулярный вес	Параметры ячейки (Å)	Разрешение съемки (Å)
Фосфатдегидрогеназа холофермент и 6 производных	80000	a=116,0; b=63,4; c=113,35; P2 _I 2 _I 2 _I	3
Термитаза (2 образца)	30000	a=47,55; b=64,05; c=72,95; P2 _I 2 _I 2 _I	1,65
Рибонуклеаза	10000	a=30,51; b=31,8; c=49,7 P2 _I P2 _I	1,50
Рибонуклеаза T=263°K T=293°K	11000	a=55,8; b=55,8; c=80,0 P3 _I	2,0
Сгс-репрессор + ДНК (2 комплекса)	18000	a=81,4; b=88,8; c=81,2 O222 _I	2,0
Трансаминаза (3 комплекса)	94000	a=124,6; b=125,9; c=56,4 P2 _I 2 _I 2 _I	3,0
Лейцинамминопептидаза	70000	a=132,4; b=132,4; c=122,1 P6 ₂ 22	2,0
Вирус см ₁ v	7800000	a=b=c=480 Å P2 ₃	6,0
Леггемоглобин T=293°K T=253°K	17000	a=92,9; b=38,3; c=52,3 γ=81,2 P2 _I	1,7
Леггемоглобин-окси-форма T=253°K	17000	a=92,9; b=38,3; c=52,3 γ=81,2 P2 _I	1,7
Церуллоплазмин (производная)	130000	a=b=269,0; c=130 I4	4,0
Пирофосфатаза (2 комплекса)	64000	a=56,3; b=116,0; c=106,8 P2 _I 2 _I 2 _I	2,5
Каталаза (3 производных)	180000	a=b=106,6; c=106,3 P4 ₂ 2 _I 2	2,5
Лейцин-специфичный белок	37500	a=68,7; b=69,3; c=74,1 P2 _I 2 _I 2 _I	2,0
Трансаминаза	94000	a=124,6; b=125,9; c=56,4 P2 _I 2 _I 2 _I	2,0

Время съемки (час)	Число независимых областей K	Число измеренных отражений I > σ (%)	Число отражений	R _{экв} , %	R _{ст} = $\frac{\sum \sigma}{\sqrt{K \sum I}}$ (%)
350	4	597500	98	4,7	3,0
80	4	130000	92	5,7	4,0
45	4	48500	60	7	4
60	I	87000	80	6	7
86	4	128000	35	7	3,5
90	4	180000	95	3	2,5
25	3	58000	30	12	13
160	8	117000	50	20	10
40	4	70000	90	4	2,5
20	4	35000	90	4	2,5
55	4	180000	55	15	20
100	3	112000	75	7	3
144	8	360000	90	6	3
36	4	76000	70	9	6
40	4	160000	70	13	8

уровне — не более 0,6 мкс. Детектор имеет хорошую однородность ширины каналов по обеим координатам, число разрешаемых элементов дифракционной картины 250x250. Электронная регистрирующая аппаратура дополнительно содержит буферную память емкостью 64К слов, имеющую инкрементный канал с быстродействием 2,5 мкс. Дифрактометр функционирует на линии с ЭВМ СМ-2М с широким набором внешних устройств. Для визуализации дифракционной картины применяется цветной телевизионный дисплей.

Для исследования структуры больших макромолекул белков, нуклеиновых кислот и вирусов с помощью синхротронного излучения в Лаборатории высоких энергий совместно с Институтом кристаллографии АН СССР разрабатывается новый рентгеновский детектор высокого разрешения со сферическим окном, аналогичный описанному в работе ^{18/}. Однако быстродействие создаваемого нами детектора увеличено в 30 раз. Схематично детектор представлен на рисунке. Входное окно диаметром 120 мм выполнено из бериллия толщиной 1 мм в виде части сферы с радиусом 120 мм. В герметичном боксе размещена пропорциональная камера с дрейфовым промежутком. Шаг намотки сигнальных нитей 1 мм. Конверсия гамма-квантов происходит в промежутке между сферической поверхностью входного окна и первым плоским проволочным электродом. Размеры образовавшегося электронного облака в процессе дрейфа заметно увеличиваются, что приводит к срабатыва-



Функциональная схема детектора и системы считывания информации. МПК — многопроволочная пропорциональная камера со сферическим входным окном из бериллия; Б — монокристаллический белок, ПР — процессор отбора событий; ВЦП — преобразователь временных интервалов в цифровой код, РП — разравнивающая память, БП — буферная память 256К 18-разрядных слов; К — контроллер для сопряжения аппаратуры считывания и ЭВМ с набором внешних устройств.

нию нескольких анодных проволочек. Это обеспечивает высокую точность по обеим координатам. Бокс заполняется ксеноном с добавками метана, избыточное давление 5 атм. Для обеспечения долговременной чистоты газа в объеме бокса располагается пассивный геттер. Информация с детектора считывается с помощью секционированных линий задержки. Мертвое время прибора — не более 0,15 мкс, что обеспечивает быстроедействие до 2×10^6 соб/с (при просчетах не более 30%). Общее число элементов разрешения дифракционной картины 500×500 элементов. Детектор предназначен для регистрации гамма-квантов с энергией до 25 кэВ.

В заключение необходимо отметить, что дифрактометры, созданные нами на основе пропорциональных камер с быстрыми линиями задержки, открыли новые возможности в исследовании монокристаллов белков. За четыре года получено около 70 полных наборов интенсивностей отражений с высоким разрешением от монокристаллов различных белков, исследование большинства которых ранее было невозможным. В общей сложности измерено более $4,5 \times 10^6$ отражений. На основе полученных данных определена пространственная структура целого ряда белков, представляющих большой научный и практический интерес, в том числе в области геной инженерии. Для исследований белков с помощью синхротронного излучения разрабатываются новые двумерные рентгеновские детекторы с высоким пространственным разрешением ($\sim 0,2$ мм) и быстроедействием в несколько мегагерц.

ЛИТЕРАТУРА

1. Andrianova M.E. et al. — Journ.Appl.Cryst., 1982, v.15, p.626.
2. Андрианова М.Е. и др. В сб.: Краткие сообщения ОИЯИ №13-85, Дубна, 1985, с.41.
3. Тепляков А.В. и др. — Кристаллография, 1986, т.31, №5, с.931.
4. Барынин В.В. и др. — ДАН СССР, 1986, т.288, №4, с.877.
5. Andrianova M.E. et al. In: Proc. of the 4-th Soviet-Italian Symposium "Macromolecules in the Functions Cell" Pushchino, Acad.of Sci. USSR, 1986, p.153.
6. Алешин А.Е. и др. — ДАН СССР, 1987, т.294, №4, с.973.
7. Анисимов Ю.С. и др. — ПТЭ, 1986, №4, с.60.
8. Durbin R.M. et al. — Science, 1986, v.232, p.1127.

Рукопись поступила 12 февраля 1988 года.