

P14-2010-65

А. В. Кривандин*, Т. Н. Муругова,
А. И. Куклин, К. О. Муранов*, Н. Б. Полянский*,
В. Л. Аксенов, М. А. Островский*

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ α -КРИСТАЛЛИНА
МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ НЕЙТРОНОВ
С ВАРИАЦИЕЙ КОНТРАСТА

*Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва

<p>Кривандин А. В. и др. Исследование структуры α-кристаллина методом малоуглового рассеяния нейтронов с вариацией контраста</p>	<p>P14-2010-65</p>
<p>Методом малоуглового рассеяния нейтронов проведено исследование структуры олигомерного белка α-кристаллина, выделенного из хрусталика глаза быка. Измерения проведены на малоугловом нейтронном спектрометре ЮМО (ИБР-2, ОИЯИ) с использованием вариации контраста (объемные доли D_2O в буфере 0, 23, 68 и 90 %). Из кривых малоуглового рассеяния определена ожидаемая точка компенсации (43 % D_2O) и получена средняя плотность длины рассеяния α-кристаллина в этой точке ($2,4 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$). Вычислены радиус инерции и функция распределения по расстояниям для этого белка. Из анализа полученных данных сделан вывод об однородном распределении рассеивающей плотности в недоступных для проникновения воды областях α-кристаллина и одинаковом дейтерировании всех полипептидных субъединиц в олигомере α-кристаллина. Одинаковое дейтерирование полипептидных субъединиц свидетельствует об их одинаковой доступности для воды, а также, вероятно, и для других низкомолекулярных веществ. Выводы о строении α-кристаллина (однородное распределение рассеивающей плотности и одинаковая доступность всех субъединиц для низкомолекулярных веществ) следует принимать во внимание при построении моделей четвертичной структуры этого белка.</p>	
<p>Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики им. И. М. Франка ОИЯИ. Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2010</p>	

<p>Krivandin A. V. et al. Study of α-Crystallin Structure by Small-Angle Neutron Scattering with Contrast Variation</p>	<p>P14-2010-65</p>
<p>The structure of the oligomeric protein α-crystallin from the bovine eye lens has been investigated by small-angle neutron scattering (SANS) by the contrast variation method (volume fraction of D_2O was 0, 23, 68 and 90%). Experiments were carried out on YuMO spectrometer (IBR-2 reactor, JINR). From the SANS curves the match point for α-crystallin (43% D_2O) and its average scattering length density at this point ($2.4 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-2}$) have been obtained. The radius of gyration and distance distribution functions for α-crystallin have been calculated as well. On the basis of these calculations it was concluded that α-crystallin has a homogeneous distribution of the scattering density in domains inaccessible for water penetration and all parts of this protein undergo a uniform deuteration. The latter indicates that all α-crystallin subunits have an equal accessibility for water and presumably for some other low molecular weight substances. These conclusions on the α-crystallin structure (a homogeneous distribution of the scattering density and an equal accessibility of all subunits for low molecular weight substances) should be taken into account in the time of elaboration of α-crystallin quaternary structure models.</p>	
<p>The investigation has been performed at the Frank Laboratory of Neutron Physics, JINR. Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2010</p>	

ВВЕДЕНИЕ

α -кристаллин является одним из основных структурно-функциональных белков хрусталика глаза позвоночных животных [1]. Это олигомерный полидисперсный белок, который состоит из нековалентно связанных полипептидных субъединиц двух типов, αA и αB , с молекулярной массой около 20 кДа каждая. Средняя молекулярная масса нативного α -кристаллина млекопитающих по данным разных исследований составляет около 700–800 кДа [1–3].

α -кристаллин способен препятствовать агрегации белков с дестабилизированной структурой и образовывать с ними комплексы (шапероноподобная активность α -кристаллина) [1, 4–6]. Агрегация белков в хрусталике может быть одной из причин его помутнения (катаракты). Считается, что шапероноподобная активность α -кристаллина способствует поддержанию прозрачности хрусталика на протяжении жизни [1].

Пространственная структура олигомеров α -кристаллина и его субъединиц неизвестна. Было выполнено компьютерное моделирование третичной структуры субъединиц α -кристаллина [7] и предложено несколько различных моделей его четвертичной структуры [2, 7, 8].

Методы малоуглового рентгеновского и нейтронного рассеяния позволяют изучать структуру биологических макромолекул в растворах [9, 10].

Большим преимуществом метода малоуглового рассеяния нейтронов является возможность менять в широких пределах разность между рассеивающими плотностями макромолекул и растворителя (контраст) путем варьирования содержания в растворителе обычной (легкой) воды (H_2O) и тяжелой воды (D_2O). Это позволяет получать ценную информацию об особенностях внутреннего строения макромолекул.

Однако в присутствии D_2O значительная часть атомов водорода в областях, легко доступных для растворителя, замещается дейтерием и такое дейтерирование может приводить к изменению структуры макромолекул, что является существенным препятствием в использовании метода вариации контраста [10]. Поэтому для корректного применения метода вариации контраста необходим анализ влияния дейтерирования на структуру изучаемых макромолекул.

Такой анализ может быть выполнен методом малоуглового рентгеновского рассеяния. Длины рассеяния водорода и дейтерия для рентгеновского излучения одинаковы. Поэтому замена в буфере H_2O на D_2O в случае применения рентгеновского излучения не приводит к изменению контраста и сравнение картин малоуглового рентгеновского рассеяния для макромолекул в буфере, приготовленном на обычной воде (H_2O -буфер), и в буфере, содержащем D_2O , позволяет судить о влиянии дейтерирования на структуру изучаемых макромолекул. В случае одинаковой картины малоуглового рентгеновского рассеяния для макромолекул в H_2O -буфере и в буфере, содержащем D_2O , применение для исследования структуры таких макромолекул метода малоуглового рассеяния нейтронов с использованием вариации контраста можно считать корректным.

В этой работе сначала был проведен анализ влияния дейтерирования на структуру α -кристаллина методом малоуглового рентгеновского рассеяния, а затем выполнено исследование четвертичной структуры этого белка в растворе методом малоуглового рассеяния нейтронов с использованием вариации контраста.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

α -кристаллин выделяли из хрусталиков глаза быка при помощи гелепроникающей хроматографии и концентрировали методом ультрафильтрации, как в [3]. Использовали буферный раствор (буфер), содержащий 20 мМ Na_2HPO_4 , 20 мМ NaH_2PO_4 , 100 мМ NaCl , 3 мМ NaN_3 , 1 мМ ЭДТА, pH 6,8. Концентрацию α -кристаллина в растворах определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм (A_{280}), используя удельный коэффициент поглощения $A_{280}(1\%, 1\text{ см}) = 8,2$, который был получен в результате измерения поглощения A_{280} растворов лиофильно высушенного α -кристаллина.

Для исследования α -кристаллина методом малоуглового рассеяния нейтронов были приготовлены растворы α -кристаллина с концентрацией 8,8 мг/мл в буфере, содержащем смесь H_2O и 0, 23, 68 и 90 % D_2O (указаны объемные проценты D_2O). Для измерения фонового рассеяния для каждого раствора α -кристаллина использовали соответствующие буферные растворы с таким же содержанием D_2O . Измерения малоуглового рассеяния нейтронов проводили на спектрометре ЮМО (ИБР-2, ОИЯИ) в двухдетекторном варианте [11] при 20 °С через 12 ч после приготовления дейтерированных растворов этого белка. Конвертирование экспериментальных спектров в зависимость когерентного дифференциального сечения рассеяния от модуля вектора рассеяния проводили с учетом пропускания образца и некогерентной составляющей рассеяния. Нормировку экспериментальных спектров проводили с помощью ванадиевого рассеивателя по стандартной процедуре с использованием программы SAS [12].

Измерения малоуглового рентгеновского рассеяния α -кристаллином и первичную обработку результатов измерения проводили в ИБХФ РАН, как описано в работе [5] (излучение $\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 0,154$ нм).

Далее обработку данных малоуглового нейтронного и рентгеновского рассеяния выполняли при помощи программы GNOM, использующей косвенное преобразование Фурье и регуляризацию решения [13, 14]. В результате такой обработки для каждого образца α -кристаллина получали функцию распределения по расстояниям $P(r)$ и рассчитанные с использованием этой функции средний радиус инерции R_g и интенсивность рассеяния в нулевой угол $I(0)$:

$$R_g^2 = \frac{\int_0^D P(r)r^2 dr}{\int_0^D P(r)dr}$$

и

$$I(0) = 4\pi \int_0^D P(r)dr,$$

где D — верхняя граница области определения функции $P(r)$ (параметр r_{\max} в программе GNOM).

Найденные так $P(r)$, R_g и $I(0)$ являются интегральными характеристиками полидисперсного раствора α -кристаллина и связаны со структурными параметрами отдельных олигомеров α -кристаллина соотношениями

$$R_g^2 = \frac{1}{I(0)} \sum_{i=1}^N (R_g)_i^2 (\bar{\rho}_i - \rho_s)^2 V_i^2, \quad (1)$$

$$I(0) = \sum_{i=1}^N (\bar{\rho}_i - \rho_s)^2 V_i^2, \quad (2)$$

$$P(r) = \sum_{i=1}^N P_i(r). \quad (3)$$

Здесь $(R_g)_i$, $\bar{\rho}_i$, V_i и $P_i(r)$ — радиус инерции, средняя плотность длины рассеяния (средняя рассеивающая плотность), парциальный объем и функция распределения по расстояниям для одного i -го олигомера α -кристаллина; N — число таких олигомеров в рассеивающем объеме; ρ_s — средняя рассеивающая плотность растворителя (буфера). Значения $(R_g)_i$, $\bar{\rho}_i$ и $P_i(r)$ выражаются через распределение рассеивающей плотности в i -м олигомере α -кристаллина $\rho_i(\vec{r})$ как

$$(R_g)_i^2 = \frac{\int_{V_i} [\rho_i(\vec{r}) - \rho_s] r^2 d\vec{r}}{\int_{V_i} [\rho_i(\vec{r}) - \rho_s] d\vec{r}},$$

$$\bar{\rho}_i = \frac{1}{V_i} \int_{V_i} \rho_i(\vec{r}) d\vec{r},$$

$$P_i(r) = r^2 \left\langle \int_{V_i} [\rho_i(\vec{r}') - \rho_s] [\rho_i(\vec{r}' - \vec{r}) - \rho_s] d\vec{r}' \right\rangle.$$

Здесь символ $\langle \rangle$ означает усреднение по всем ориентациям вектора \vec{r} ; начало координат в выражении для $(R_g)_i$ выбрано в центре масс i -го олигомера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ влияния дейтерирования на структуру α -кристаллина, выполненный методом малоуглового рентгеновского рассеяния. Для анализа влияния дейтерирования на структуру α -кристаллина было выполнено сравнительное исследование методом малоуглового рентгеновского рассеяния структуры α -кристаллина в H_2O -буфере и в буфере, содержащем 90 % D_2O . Измерения малоуглового рентгеновского рассеяния были проведены на двух препаратах α -кристаллина, полученных в результате двух разных выделений этого белка, через разные промежутки времени (через 1, 3, 10 и 30 сут) после приготовления дейтерированных растворов α -кристаллина. Результаты измерений α -кристаллина в дейтерированном буфере в пределах точности эксперимента не отличались от результатов измерения образцов α -кристаллина в H_2O -буфере.

Для примера на рис. 1 приведены экспериментальные кривые малоуглового рентгеновского рассеяния для α -кристаллина в H_2O -буфере и в буфере,

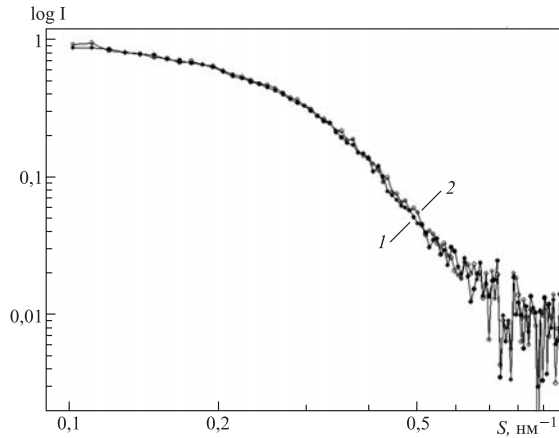


Рис. 1. Экспериментальные кривые малоуглового рентгеновского рассеяния для α -кристаллина в H_2O -буфере (1) и в буфере, содержащем 90 % D_2O (2). Концентрация белка 8,8 мг/мл

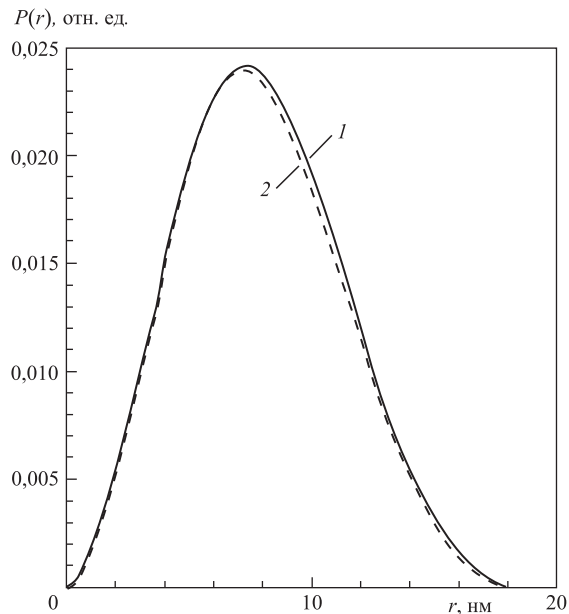


Рис. 2. Функции распределения по расстояниям для α -кристаллина в H_2O -буфере (1) и в буфере, содержащем 90% D_2O (2), рассчитанные по кривым малоуглового рентгеновского рассеяния, приведенным на рис. 1

содержащем 90% D_2O , измеренные через 3 сут после дейтерирования раствора ($S = (4\pi \sin \theta)/\lambda$ — модуль вектора рассеяния; 2θ — угол рассеяния; λ — длина волны излучения). На рис. 2 показаны рассчитанные по этим кривым функции распределения по расстояниям $P(r)$.

Как видно (рис. 1, 2), кривые малоуглового рассеяния и функции $P(r)$ для α -кристаллина в H_2O -буфере и в буфере, содержащем 90% D_2O , практически идентичны. Максимальный размер олигомеров α -кристаллина, судя по значению r , при котором функции $P(r)$ обращаются в ноль, составляет около 18 нм (рис. 2). Для радиуса инерции α -кристаллина в этих образцах были получены значения 6,07 нм для H_2O -буфера и 6,01 нм для буфера, содержащего 90% D_2O . Различия в этих значениях R_g находятся в пределах точности эксперимента.

Таким образом, дейтерирование раствора не оказывает существенного влияния на структуру α -кристаллина (естественно, имеется в виду структурный уровень, к которому чувствительны методы малоуглового рассеяния, т. е. прежде всего четвертичная структура). Следовательно, вариация контраста при помощи D_2O может быть использована для исследования структуры α -кристаллина методом малоуглового рассеяния нейтронов.

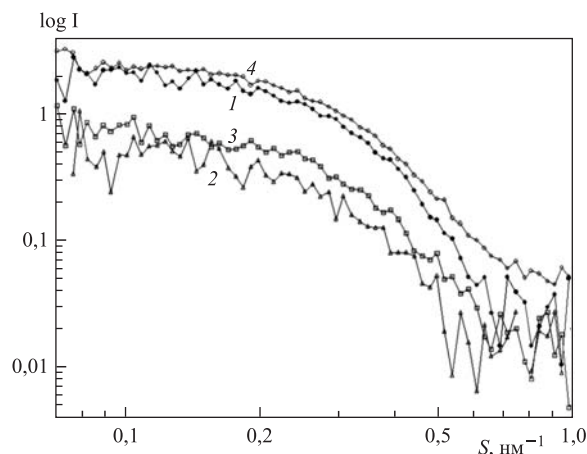


Рис. 3. Экспериментальные кривые малоуглового рассеяния нейтронов для α -кристаллина в буферных растворах с объемной долей D_2O , равной 0, 23, 68 и 90 % (1, 2, 3, 4 соответственно). Концентрация α -кристаллина в растворах 8,8 мг/мл

Исследование структуры α -кристаллина методом малоуглового рассеяния нейтронов с использованием вариации контраста. Экспериментальные кривые малоуглового рассеяния нейтронов для α -кристаллина в буфере с различным содержанием D_2O (0, 23, 68 и 90 %) показаны на рис. 3.

Рассчитанные по этим кривым значения радиуса инерции R_g и интенсивности рассеяния в нулевой угол $I(0)$, а также ошибки их определения приведены в таблице. Функции распределения по расстояниям $P(r)$, которым соответствуют приведенные в таблице значения R_g и $I(0)$, показаны на рис. 4. Все эти функции $P(r)$ и приведенные в таблице значения R_g и $I(0)$ были рассчитаны при помощи программы GNOM для интервала $S = 0,077-0,975 \text{ nm}^{-1}$ при значении $r_{\text{max}} = 18 \text{ nm}$, условии $P(r_{\text{max}}) = 0$ и параметре регуляризации $ALPHA = 1$.

Как видно из таблицы, интенсивность рассеяния в нулевой угол $I(0)$ для α -кристаллина существенно зависит от содержания D_2O в растворе. Рассмотрим этот вопрос подробнее с учетом дейтерирования белков.

Значения радиуса инерции R_g и интенсивности рассеяния в нулевой угол $I(0)$ для α -кристаллина в буферных растворах с разной объемной долей D_2O

Объемная доля D_2O , %	R_g , нм	$I(0)$, отн. ед.
0	$5,74 \pm 0,13$	$2,20 \pm 0,06$
23	$5,85 \pm 0,23$	$0,50 \pm 0,03$
68	$5,90 \pm 0,14$	$0,80 \pm 0,03$
90	$5,83 \pm 0,08$	$2,70 \pm 0,05$

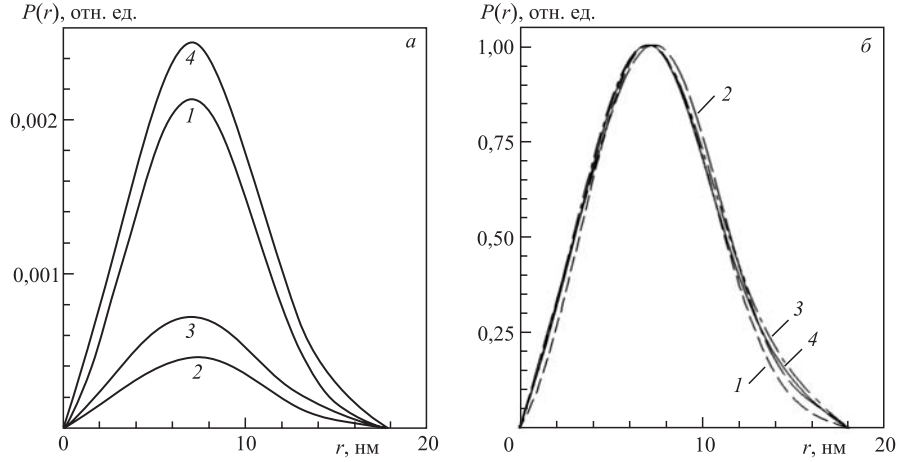


Рис. 4. Функции распределения по расстояниям $P(r)$ для α -кристаллина в буферных растворах с объемной долей D_2O , равной 0, 23, 68 и 90 % (1, 2, 3, 4 соответственно): a — результат расчета по экспериментальным кривым малоуглового нейтронного рассеяния; b — эти же функции после нормировки по их максимальным значениям

Предположим, как в [10], что белки дейтерируются пропорционально объемной доле D_2O в растворе, которую обозначим как Y . Тогда для каждой i -й белковой частицы (в нашем случае для i -го олигомера α -кристаллина)

$$\bar{\rho}_i = a_i Y + b_i. \quad (4)$$

Учтем, что для растворителя, содержащего смесь H_2O и D_2O ,

$$\rho_s = a_s Y + b_s, \quad (5)$$

где a_i , b_i , a_s , b_s — константы. Подставив (4), (5) в (2), получим квадратичную зависимость $I(0)$ от Y :

$$I(0) = Y^2 \sum_{i=1}^N (a_i - a_s)^2 V_i^2 + 2Y \sum_{i=1}^N (a_i - a_s)(b_i - b_s) V_i^2 + \sum_{i=1}^N (b_i - b_s)^2 V_i^2. \quad (6)$$

Если для всех белковых частиц средняя плотность рассеяния $\bar{\rho}_i$ одинакова и равна

$$\bar{\rho} = aY + b, \quad (7)$$

то выражение (6) упрощается:

$$I(0) = [(a - a_s)Y + (b - b_s)]^2 \sum_{i=1}^N V_i^2. \quad (8)$$

В этом случае существует точка компенсации $Y = (b_s - b)/(a - a_s)$, в которой $I(0)$ принимает значение, равное нулю. Если же средняя плотность рассеяния белковых частиц различается, истинной точки компенсации, в которой $I(0) = 0$, не будет. В этом случае можно говорить о некоторой условной (эффективной [15]) точке компенсации, в которой $I(0)$ принимает минимальное значение.

Экспериментальные значения $I(0)$, полученные для α -кристаллина при разной объемной доле D_2O в растворе (см. таблицу), хорошо аппроксимируются квадратичной функцией $AY^2 + BY + C$, где A, B, C — константы (рис. 5). Это подтверждает предположение о том, что α -кристаллин дейтерируется пропорционально объемной доле D_2O в растворе.

Парабола на рис. 5 принимает минимальное значение, близкое к нулю при объемной доле D_2O в растворе $Y = 0,427$. Незначительное превышение нулевого уровня в точке минимума этой функции может быть связано как с ошибками эксперимента, так и с небольшими различиями в средней рассеивающей плотности отдельных олигомеров α -кристаллина (для выяснения этого вопроса требуются дополнительные исследования).

Таким образом, точка компенсации (истинная, если в этой точке $I(0) = 0$, или эффективная, если $I(0)$ принимает в этой точке минимальное значение,

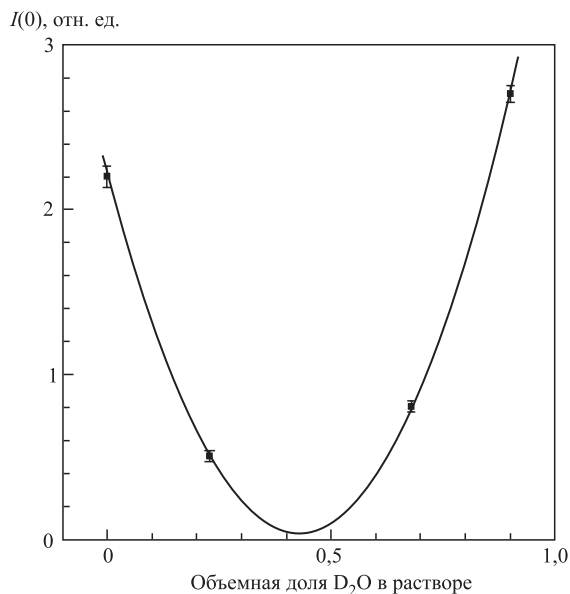


Рис. 5. Экспериментальная зависимость интенсивности нейтронного рассеяния α -кристаллином в нулевой угол $I(0)$ от объемной доли D_2O в буферном растворе и ее аппроксимация квадратичной функцией

не равное нулю) должна наблюдаться для α -кристаллина примерно при 43 % D_2O в растворе.

Средняя плотность рассеяния для α -кристаллина в этой точке $\bar{\rho} = \rho_s = 2,4 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$. Здесь для расчета ρ_s было использовано соотношение (5), которое с учетом значений рассеивающей плотности для D_2O и H_2O ($6,34 \cdot 10^{10}$ и $-0,56 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$ [9]) можно записать как

$$\rho_S = (6,9Y - 0,56) \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}. \quad (9)$$

Следует отметить, что изменение в разумных пределах при расчете $I(0)$ в программе GNOM интервала S , значения r_{\max} и параметра регуляризации ALPNA не приводило к изменению значения точки компенсации более чем на $\pm 0,5\%$. Поэтому полученные для α -кристаллина значения точки компенсации и $\bar{\rho}$ являются достаточно надежными. Эти значения близки к значениям, полученным для других белков [10].

Используя найденное для α -кристаллина значение $\bar{\rho}$ в точке компенсации и значение $\bar{\rho}$ для недеитерированных белков ($1,9 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$ [9]), получаем вместо (7) числовую зависимость для средней рассеивающей плотности α -кристаллина от объемной доли D_2O в растворе:

$$\bar{\rho} = (1,16Y + 1,9) \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2} \quad (10)$$

и находим средний контраст

$$\Delta\rho = \bar{\rho} - \rho_s = (-5,74Y + 2,46) \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}. \quad (11)$$

Рассмотрим теперь, какие выводы можно сделать на основании значений радиуса инерции R_g , полученных для α -кристаллина в растворах с разным содержанием D_2O (см. таблицу).

Как видно из таблицы, значения R_g для α -кристаллина при разном содержании D_2O в растворе различаются незначительно и эти различия находятся в пределах точности эксперимента. Из этого следует, что если структуре α -кристаллина и присущи какие-то неоднородности плотности, то они невелики.

Проведем количественную оценку возможных неоднородностей плотности α -кристаллина на основании полученных значений R_g (см. таблицу). Будем считать, что средняя рассеивающая плотность олигомеров α -кристаллина $\bar{\rho}$ хотя и меняется за счет дейтерирования, но при каждом соотношении H_2O/D_2O в растворе для всех олигомеров одинакова. Это допущение следует из того, что в ожидаемой точке компенсации интенсивность рассеяния близка к нулю (см. рис. 5). Воспользуемся соотношением [9, 16]

$$R_g^2 = R_c^2 + \frac{\bar{\rho}}{\Delta\rho} (R_p^2 + L^2 - R_c^2) - \frac{\bar{\rho}^2}{\Delta\rho^2} L^2. \quad (12)$$

Здесь R_p — радиус инерции области частицы (олигомера α -кристаллина), недоступной растворителю; R_c — радиус инерции формы этой области (радиус инерции, который имела бы эта область при однородном распределении в ней рассеивающей плотности); L — расстояние между центрами масс этих областей; $\bar{\rho}$ — средняя плотность длины рассеяния частицы; $\Delta\rho$ — контраст. Для частиц с однородным распределением рассеивающей плотности $R_c = R_p$. При наличии неоднородностей в распределении рассеивающей плотности в частице $R_c \neq R_p$.

Соотношение (12) применимо и для полидисперсных систем, к которым относится α -кристаллин. В этом случае R_c , R_p и L в (12) являются средними (эффективными) значениями, которые связаны с соответствующими параметрами отдельных частиц $(R_p)_i$, $(R_c)_i$ и L_i соотношениями

$$R_c^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (R_c)_i^2 V_i^2}{\sum_{i=1}^N V_i^2}, \quad (13)$$

$$R_p^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (R_p)_i^2 V_i^2}{\sum_{i=1}^N V_i^2}, \quad (14)$$

$$L^2 = \frac{\sum_{i=1}^N L_i^2 V_i^2}{\sum_{i=1}^N V_i^2}, \quad (15)$$

где V_i — объем одной частицы; N — число частиц в рассеивающем объеме образца. Как видно из (12), зависимость R_g^2 от $\bar{\rho}/\Delta\rho$ в общем случае выражается квадратичной функцией.

Экспериментальные значения R_g^2 (см. таблицу) как функция от $\bar{\rho}/\Delta\rho$ и их аппроксимация по формуле (12) представлены на рис. 6 (R_c , R_p и L — параметры аппроксимации). Значения $\bar{\rho}$ и $\Delta\rho$ были рассчитаны по формулам (10), (11). В результате такой аппроксимации были получены значения $L = 0$, $R_c = 5,81 \pm 0,07$ нм и $R_p = 5,77 \pm 0,08$ нм. Как видно, значения R_c и R_p в пределах точности их определения совпадают. Максимальное возможное различие в значениях R_c и R_p с учетом приведенных ошибок не превышает 0,2 нм, что составляет около 3% от величины радиуса инерции олигомера α -кристаллина.

К таким же выводам об однородности структуры α -кристаллина приводит сравнение функций распределения по расстояниям $P(r)$, полученных при разном содержании D_2O в растворе (рис. 4). Эти распределения имеют очень

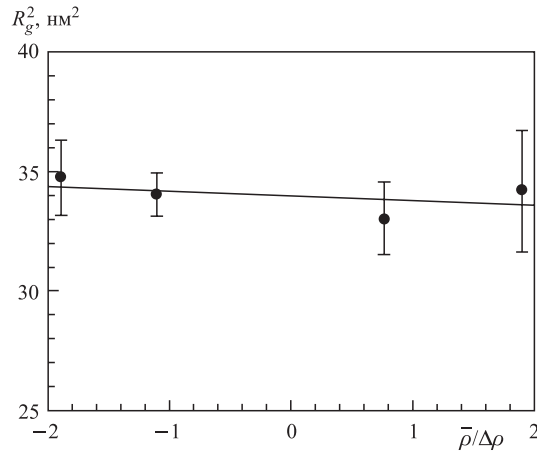


Рис. 6. Экспериментальная зависимость R_g^2 от $\bar{\rho}/\Delta\rho$ для α -кристаллина в буферных растворах с разным содержанием D_2O и ее аппроксимация по формуле (12)

похожую форму, что хорошо видно после их нормировки по максимальному значению (рис. 4, б). На основании этого можно говорить об одинаковом распределении рассеивающей плотности в олигомерах α -кристаллина при разном контрасте, что возможно только в случае однородного распределения плотности. Для функций $P(r)$, рассчитанных по данным малоуглового рассеяния нейтронов (рис. 4), как и в случае малоуглового рентгеновского рассеяния (рис. 2), наблюдается максимум при $R \approx 7$ нм и плавный спад к нулю при $R \approx 18$. Такой вид функций $P(r)$ характерен для частиц с невысокой степенью анизотрии.

Таким образом, результаты анализа значений радиуса инерции и функций распределения по расстояниям $P(r)$, выполненного для α -кристаллина при разных соотношениях $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ в растворе, показывают, что α -кристаллин имеет однородное распределение рассеивающей плотности в областях, недоступных для проникновения растворителя (воды), и дейтерируется равномерно по всему объему олигомера.

Конечно, однородность распределения рассеивающей плотности и равномерность дейтерирования здесь следует понимать с учетом разрешения метода малоуглового рассеяния (1–2 нм). Из полученных результатов не следует, что дейтерирование каждой отдельной субъединицы α -кристаллина также должно быть равномерным по ее объему. В каждой субъединице, по-видимому, преимущественно дейтерируются поверхностные, легко доступные для воды, атомные группы. Однако в случае одинакового дейтерирования всех субъединиц дейтерирование в среднем по всему объему олигомера α -кристаллина,

состоящего из ~ 40 таких субъединиц, с учетом разрешения метода малоуглового рассеяния может выглядеть равномерным.

Из одинакового дейтерирования всех субъединиц в олигомере α -кристаллина можно сделать вывод, что все эти субъединицы одинаково доступны для молекул воды, а также, возможно, и для других низкомолекулярных соединений, в том числе биологически активных веществ. В свете этого модель четвертичной структуры α -кристаллина с трехслойным расположением субъединиц [2] представляется менее вероятной, чем модели, в которых все субъединицы имеют эквивалентные положения [7, 8].

Следует отметить, что недоступные для проникновения воды области в олигомере α -кристаллина — это, по-видимому, прежде всего сами полипептидные субъединицы (их внутренняя часть). Но, кроме этого, можно представить и какие-то межсубъединичные области в олигомере α -кристаллина (например замкнутую внутреннюю полость), которые также могут быть недоступны для проникновения воды. Полученные в этой работе результаты показывают, что в тех областях олигомера α -кристаллина, куда не проникает вода, распределение рассеивающей плотности является однородным. Из этого, в частности, следует, что в олигомере α -кристаллина не содержится полостей, недоступных для проникновения воды. Это согласуется как с наличием свободных промежутков между субъединицами α -кристаллина, которые должны быть, согласно мицеллоподобной модели строения этого белка [7], так и с существованием открытой полости в его центральной части, согласно структурным моделям, предложенным в работах [8, 17].

Средний радиус инерции R_g , полученный для α -кристаллина в этой работе при помощи малоуглового рассеяния нейтронов, составляет около 5,8 нм. Это на 4–8 % меньше значений, полученных нами методом малоуглового рентгеновского рассеяния в настоящей работе и в [3, 6]. Такие различия в радиусах инерции белков, полученные с помощью малоуглового нейтронного и рентгеновского рассеяния, как было показано [18], могут быть связаны с гидратацией белков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом малоуглового рентгеновского рассеяния показано, что дейтерирование не оказывает существенного влияния на четвертичную структуру α -кристаллина. Это обосновывает корректность применения метода вариации контраста для исследования структуры α -кристаллина при помощи малоуглового рассеяния нейтронов.

Проведено измерение малоуглового нейтронного рассеяния для растворов α -кристаллина с объемной долей D_2O , равной 0, 23, 68 и 90 %. По интенсивности нейтронного рассеяния в нулевой угол для α -кристаллина определена

ожидаемая точка компенсации (43 % D₂O) и средняя плотность рассеяния ($2,4 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$) в этой точке.

На основании значений радиуса инерции и функций распределения по расстояниям, рассчитанных для α -кристаллина по данным малоуглового нейтронного рассеяния для растворов с разным отношением D₂O/H₂O, сделан вывод об однородном распределении рассеивающей плотности в недоступных для проникновения воды областях α -кристаллина и о равномерном дейтерировании α -кристаллина по всему объему олигомера. Следовательно, в α -кристаллине не содержится полостей, в которые не может проникать вода, и все субъединицы этого полидисперсного олигомерного белка одинаково доступны для молекул воды, а также, возможно, и для других низкомолекулярных соединений, в том числе биологически активных веществ. Эти выводы о строении α -кристаллина следует принимать во внимание при построении модели четвертичной структуры α -кристаллина.

Авторы выражают благодарность А. Х. Исламову и М. В. Авдееву за помощь в организации и проведении эксперимента по малоугловому рассеянию нейтронов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 08-04-01787-а) и Госконтракта № 02.740.11.0542.

ЛИТЕРАТУРА

1. Horwitz J. // Exp. Eye Res. 2003. V. 76. P. 145–153.
2. Tardieu A., Laporte D., Lichino P., Krop B., Delae M. // J. Mol. Biol. 1986. V. 192. P. 711–724.
3. Кривандин А. В., Муранов К. О., Яковлев Ф. Ю., Полянский Н. Б., Вассерман Л. А., Островский М. А. // Биохимия. 2009. Т. 74, № 6. С. 779–790.
4. Horwitz J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 10449–10453.
5. Кривандин А. В., Муранов К. О., Островский М. А. // Молекулярная биология. 2004. Т. 38, № 3. С. 532–546.
6. Кривандин А. В., Муранов К. О., Потураева И. Д., Полянский Н. Б., Островский М. А. // ДАН. 2006. Т. 409, № 4. С. 550–554.
7. Groth-Vasselli B., Kumosinski T. F., Farnsworth P. N. // Exp. Eye Res. 1995. V. 61. P. 249–253.
8. Peschek J., Braun N., Franzmann T. M., Georgalis Y., Haslbeck M., Weinkauff S., Buchner J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106, No. 32. P. 13272–13277.
9. Свергун Д. И., Фейгин Л. А. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. М.: Наука, 1986.
10. Останевич Ю. М., Сердюк И. И. // Успехи физических наук. 1982. Т. 137, вып. 1. С. 85–111.
11. Kuklin A. I., Islamov A. Kh., Gordeliy V. I. // Neutron News. 2005. V. 16, No. 3. P. 16–18.

12. Соловьев А. Г., Соловьева Т. М., Стадник А. В., Исламов А. Х., Куклин А. И. Сообщение ОИЯИ Р10-2003-86. Дубна, 2003.
13. Свергун Д. И., Семенюк А. В. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 297. С. 1373–1377.
14. Svergun D. I. // J. Appl. Cryst. 1992. V. 25. P. 495–503.
15. Avdeev M. V. // J. Appl. Cryst. 2007. V. 40. P. 56–70.
16. Stuhrmann H. B., Miller A. // J. Appl. Cryst. 1978. V. 11. P. 325–345.
17. Haley D. A., Horwitz J., Stewart P. L. // J. Mol. Biol. 1998. V. 277. P. 27–35.
18. Svergun D. I., Richard S. Koch M. H. J., Sayers Z., Kuprin S., Zaccari G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 2267–2272.

Получено 25 мая 2010 г.

Редактор *А. И. Петровская*

Подписано в печать 16.07.2010.

Формат 60 × 90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 1,06. Уч.-изд. л. 1,26. Тираж 290 экз. Заказ № 57054.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.

E-mail: publish@jinr.ru

www.jinr.ru/publish/