



УДК 577.142.7.088.52

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
УГЛЕВОДНОГО КОМПЛЕКСА ЛЕКТИНА
ИЗ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM*)

Лобсанов Ю. Д., Кузев С. В., Рисулов Р. Р., Рыскин А. И.*,
Плетнев В. З., Мокульский М. А.

Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва;

* Институт кристаллографии Академии наук СССР,
Москва

Методом рентгеноструктурного анализа исследован комплекс белка лектина из гороха с подзамещенным углеводом при разрешении 3 Å. Углеводсвязывающий активный центр молекулы представляет собой неглубокий карман, образованный аминокислотными петлями 78–81, 98–102, 123–128, 215–218 и расположенный с внешней стороны скрученного β-слоя, недалеко от области связывания атомов Са и Мп. Указана предположительная ориентация молекулы углевода в активном центре белка.

Лектины образуют класс очень интересных объектов для изучения структурных аспектов специфичности углеводного связывания [1].

Белок лектин из семян гороха принадлежит к группе маннозо- и глюкозоспецифичных Са, Мп-содержащих лектинов. Трехмерная структура кристаллического димера этого белка определена с разрешением 3 Å [2, 3]. Отличительной особенностью пространственной организации каждого мономера является наличие регулярной β-супервторичной структуры, образованной двумя контактирующими по поверхности β-слоями (уплощенным и сильно скрученным) из шести и семи антипараллельных β-тяжей соответственно. По топологии пространственной укладки полипептидной цепи структура лектина из гороха близка к структурам родственных белков — конканавалина А [4] и фафина (лектина из *Vicia faba*) [5], установленным при разрешении 1,7 и 2,8 Å соответственно.

К настоящему времени при разрешении 6 Å получены приблизительные структурные данные относительно локализации углевода — метил-α-D-маннопиранозида в трехмерной структуре конканавалина А [6]. Певысокое качество кристаллов соответствующего комплекса не позволило получить детальной стереохимической картины связывания углеводной молекулы белком; вероятный механизм белок-углеводного взаимодействия был предложен на основе лишь модельного анализа [4].

В этой связи представлялось важным получение качественных кристаллов комплекса лектин — углевод, позволяющих установить при высоком разрешении структурные особенности связывания углевода в активном центре белка.

Американскими учеными методом сокристаллизации получен кристаллический комплекс лектина из гороха с триманнозидом [7]. Однако большие отличия параметров соответствующей кристаллической ячейки от таковых для кристаллов нативного белка существенно затрудняют решение поставленной структурной задачи.

В настоящее время ведется работа по исследованию углеводного комплекса фафина; опубликованы предварительные данные по локализации глюкозы в активном центре этого белка [5].

В настоящей статье представлены результаты предварительного рентгеноструктурного исследования при разрешении 3 Å комплекса лектина из гороха (*Pisum sativum*) с подзамещенным производным глюкозы — бензил-2-ацетида-2,3-дидезокси-3-под-α-D-глюкопиранозидом.



Стереонизображение C^{α} -углеродного скелета мономера лектина из гороха при разрешении 3 Å. Показаны атомы Ca (1), Mn (2) и положение молекулы углевода (3)

На карте электронной плотности, полученной разностным синтезом Фурье с коэффициентами $F_p - F_c$ (F_p и F_c — структурные факторы соответственно кристаллов белка и его комплекса), проявился высокий пик с координатами $x=0,7$, $y=0,57$, $z=0,809$ (в долях ячейки), интерпретированный как место нахождения углеводного иода. Анализ данного района показал, что область связывания углевода в белковой структуре представляет собой неглубокий карман, ограниченный аминокислотными петлями 78–81, 98–102, 123–128, 215–218 и расположенный с внешней стороны скрученного β -слоя, недалеко от атомов Ca и Mn (рисунок). Аналогичное расположение углеводсвязывающих областей найдено в конканавалине А [4] и в фавине [5]. Расстояния между атомом углеводного иода и атомами Ca и Mn (отстоящими друг от друга на 4,6 Å) в составе лектина из гороха равны соответственно 6,7 и 10,8 Å. При этом иод располагается рядом с прямой, проходящей через атомы металлов. Расстояние I...Mn в исследуемом комплексе несколько меньше оцененного по модели расстояния 13–15 Å между центром глюкопиранозного кольца и атомом Mn в соответствующем комплексе конканавалина А [4]. Это предполагает, что ориентация глюкопиранозного цикла в активном центре лектина из гороха характеризуется ближним расположением атома C-3 с присоединенным иодом по отношению к Ca и Mn.

Интересно отметить, что на карте электронной плотности димерной структуры лектина, обладающей двумя углеводсвязывающими центрами, проявился только один пик посадки углеводной молекулы. Этот эффект, по-видимому, связан с различием в доступности активных центров белка вследствие неэквивалентности стереохимического окружения отдельных мономеров в кристаллической ячейке. Вероятно, по этой причине образование лектин-углеводного комплекса методом сокристаллизации сопровождается существенными изменениями нативной кристаллической упаковки [7].

Детальную картину структурной организации углеводного комплекса лектина из гороха, включая область связывающего центра, планируется получить при более высоком разрешении.

Экспериментальная часть

Для получения соответствующего комплекса монокристаллы нативного лектина [8] вымачивали при 4°C в растворе 1 мМ бензил-2-ацетамидо-2,3-дидезокси-3-иод- α -D-глюкопиранозид в 0,02 М ацетатном буфере, pH 7,2, содержащем 20% C_2H_5OH . Оптимизация условий проводилась путем варьирования параметров вымачивания с последующим контролем за присоединением углевода дифрактометрическим методом и по прецессионным рентгенограммам. Полученные кристаллы комплекса сохраняли необходимый изоморфизм по отношению к кристаллам нативного белка.

Полный набор дифракционных данных от кристаллического комплекса получен с одного кристалла методом вращения ($\lambda=1,5418$ Å) для сферы разрешения 2,4 Å на многоканальном дифрактометре «Аргус» [9]. Для измерения интенсивностей дифракционных отражений в соответствующем углеводном интервале «мертвой зоны» кавиллярно первоначальному положению. Обработка данных проводилась с помощью комплекса программ «Детектор» [9]. Внутренний R-фактор по симметричным рефлексам при разрешении 2,4 Å составил 3,7%.

Для дальнейших перспективных исследований набор экспериментальных данных соответствующего комплекса был расширен фотометодом до разрешения 2 Å в син-

хротронном центре Дарсбери (Великобритания) с использованием монохроматизированного излучения $\lambda=0,871 \text{ \AA}$ (сила тока $I=118 \text{ mA}$, метод вращения; расстояние кристалл — пленка $D=86 \text{ мм}$). Для оптимизации общего количества рентгенограмм без перекрытия рефлексов интервал вращения при съемке менялся от $0,6$ до $1,7^\circ$. Полученный набор рентгенограмм состоял из 91 пакета по три пленки. Каждый пакет включал приблизительно по 2000 пригодных для обработки отражений, из которых $\sim 25\%$ экспонировано частично. Размер рефлексов вместе с областью фона в центральной части рентгенограммы составлял 750 мкм .

Сканирование рентгенограмм проводилось на денситометре OPTRONIX P-1000 с растром 50 мкм , обработка полученных данных осуществлялась на ЭВМ NORD-100/500 с использованием комплекса программ AW-NORD [10]. Величины среднеквадратичных ошибок определения центра пятна составляли для центральной части рентгенограммы $10\text{--}18 \text{ мкм}$, для всего снимка — не более $15\text{--}27 \text{ мкм}$.

Единый массив экспериментальных данных в сфере разрешения 2 \AA (24 905 независимых отражений с интенсивностью $I>2\sigma$) после приведения к общей шкале и усреднения эквивалентов отвечал внутреннему R -фактору $3,8\%$.

R -Факторы сравнения, вычисленные по модулям структурных факторов нативного белка F_p и кристаллов его комплекса с углеводом, снятых на многоканальном дифрактометре (F_{c1}) и фотометодом (F_{c2}) при разрешении 3 \AA , составили $R_{pc1} = R_{pc2} = 12\%$.

Использование экспериментальных данных областей 3 \AA обоих наборов привело к совпадающим структурным результатам.

Авторы выражают глубокую благодарность Н. В. Бовину (ИБХ АН СССР) за предоставление иодзамещенного глюкозида, М. Папижу (Синхротронный центр в Дарсбери, Великобритания) за помощь в проведении рентгеновского эксперимента на синхротроне и А. А. Вагину (ИКАН СССР) за помощь в получении стереопары.

ЛИТЕРАТУРА

1. Etzler M. E. // Annu. Rev. Plant Physiol. 1985. V. 36. P. 209–234.
2. Riskulov P. P., Kuzev S. V., Lobanov Yu. D., Lubnin M. Yu., Mokuльская T. D., Mokuльский M. A. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 292. № 2. С. 486–490.
3. Einspahr J., Suguna K., Bugg C. E., Suddath F. L. // Abstracts of the Thirteenth International Congress of Crystallography. 1984. Hamburg. 02. 1–2.
4. Hardman K. D., Agarwal R. C., Freiser M. J. // J. Mol. Biol. 1982. V. 157. № 1. P. 69–86.
5. Reeke G. N., Jr., Becker J. W. // Science. 1986. V. 234. № 4780. P. 1108–1110.
6. Hardman K. D., Ainsworth C. F. // Biochemistry. 1976. V. 15. № 5. P. 1120–1128.
7. Rini J. M., Carver J. P., Hardman K. D. // J. Mol. Biol. 1986. V. 189. № 1. P. 259–260.
8. Riskulov P. P., Доброхотова З. Д., Кузев С. В., Лобанов Ю. Д., Лубнин М. Ю., Мokuльская Т. Д., Мышко Г. Е., Проскудина Л. Т., Рогачева М. М., Сапрыкина Л. Ф., Хренов А. А., Мokuльский М. А. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 277. № 6. С. 1494–1498.
9. Мokuльская Т. Д., Кузев С. В., Лубнин М. Ю., Мышко Г. Е., Никитин А. А., Сапрыкина Л. Ф., Сметанина Е. П., Хренов А. А., Мokuльский М. А., Доброхотова З. Д., Володенков А. Я., Мосенкова И. Ю., Рязина Н. А., Рубанов В. П., Сафарова И. И., Янкина Н. С., Шитиков Б. И., Бару С. Е., Сидоров В. А., Хабашаев А. Г., Савинов Г. А., Шувалов Б. Н. // Кристаллография. 1982. Т. 27. Вып. 4. С. 775–784.
10. Рыскин А. И. // Кристаллография. 1986. Т. 31. Вып. 2. С. 387–389.

Поступила в редакцию
17.III.1987

PRELIMINARY X-RAY STUDIES OF THE CARBOHYDRATE COMPLEX OF PEA LECTIN (*PISUM SATIVUM*)

I OBSANOV Yu. D., KUZEV S. V., RISKULOV R. R., RYSKIN A. P.,
PLETNEV V. Z., MOKULSKII M. A.

*Institute of Molecular Genetics;
*Institute of Crystallography, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

Pea lectin complex with an iodine-substituted carbohydrate has been studied by X-ray method at 3 \AA resolution. The saccharide binding site of the molecule is localized in a shallow cleft formed by amino acid loops 78–81, 98–102, 123–128, 215–218. It is arranged on the outer side of twisted β -sheet near the Ca, Mn binding region. An orientation of the saccharide molecule in the binding site is proposed.