



УДК 577.112.7.088.52

© 1990 г.

Ю. Д. Лобсанов, В. З. Плетьев, Н. Н. Втюрин,
М. Ю. Лубнин, М. А. Мокульский, А. Г. Уржумцев*,
В. Ю. Лукин*, Т. Б. Лузянина*

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПЛЕКСА ЛЕКТИНА ИЗ ГОРОХА С УГЛЕВОДОМ ПРИ РАЗРЕШЕНИИ 2,4 Å I. АТОМНАЯ МОДЕЛЬ

Институт молекулярной генетики АН СССР, Москва;

* Научно-исследовательский вычислительный центр Научного центра биологических исследований АН СССР,
Пушино Московской обл.

Методом рентгеноструктурного анализа на атомном уровне определена пространственная структура комплекса углеводспецифичного белка лектина из семян гороха (*Pisum sativum*) с глюкозидом. Молекула представляет собой димер из идентичных мономеров. Пространственная организация каждого мономера характеризуется наличием развитой β -структуры. Она состоит из двух основных контактирующих по поверхности β -слоев (плоского и изогнутого), включающих в себя соответственно шесть и семь антипараллельных β -тяжей, и дополнительного неидеально сформированного β -слоя из пяти тяжей. Этот третий β -слой располагается почти перпендикулярно к уплощенному слою и параллельно к краевой части изогнутого слоя. Такое расположение слоев в супервторичной структуре обеспечивает эффективное экранирование внутреннего гидрофобного ядра мономера, в формировании которого участвуют боковые цепи 56 аминокислотных остатков. Стабилизация димерной молекулы осуществляется за счет водородных связей и солевых мостиков между мономерами.

Лектины — углеводсвязывающие белки неиммунной природы, агглютинирующие клетки и/или агрегирующие гликоконъюгаты. Связывание углевода лектинами происходит специфично и обратимо, без нарушения ковалентной структуры связываемого полимера. Лектины широко распространены в живой природе. Функциональная роль их остается пока малоизученной. Однако известно, что лектин-углеводные взаимодействия включены в такие процессы, как эндо- и фагоцитоз, очистка биологических систем от вредных и чужеродных агентов, хоминг клетки, компартментализация гликоконъюгатов в органеллах, морфогенез в процессе развития некоторых организмов и т. д. [1]. В последнее время появляется все больше свидетельств того, что лектины бобовых растений, среди них и лектин гороха, включены в механизм симбиоза этих растений с азотфиксирующими бактериями [2, 3]. Лектины широко используются в медицине в качестве компонентов лекарственных препаратов, как молекулярные инструменты для исследования гликопротеинов и углеводов.

Наиболее хорошо изучены лектины семян овощных растений. Среди них лектины гороха, чечевицы, конских бобов (фавин), канавалии мечевидной (конканавалин А, Con A). У лектинов этой группы выявлена тесная гомология по первичной [4] и пространственной [5—7] структурам. Все они относятся к Са, Мп-связывающим белкам, и эти ионы необходимы для углеводного связывания. Перечисленные лектины проявляют специфичность к маннозе и глюкозе. Имеется обширная литература по исследованию тонкой углеводной специфичности лектинов этой группы [8—10].

Определены трехмерные структуры ряда белков этой группы: Con A [11] и его комплекса с сахаридом [12], фавина [7], лектина гороха [6, 13] и его комплекса с трисахаридом [14] и моносахаридом [15].

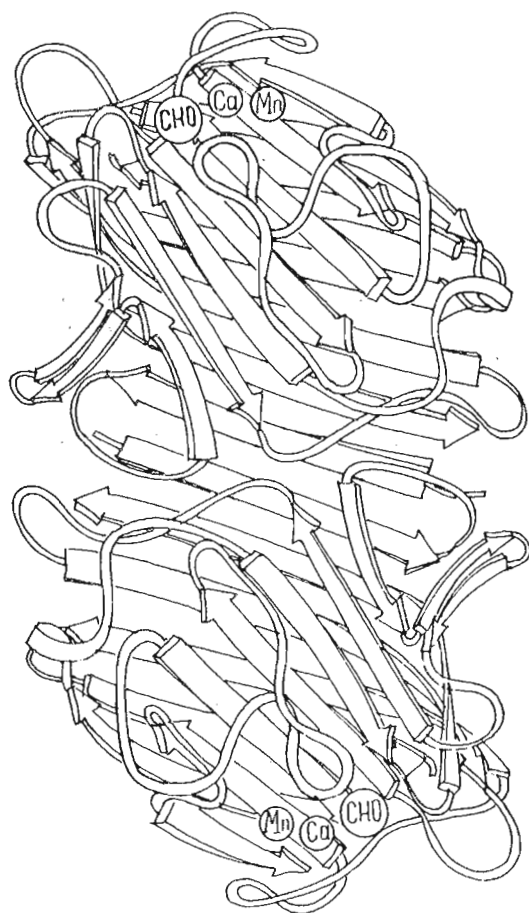


Рис. 1. Изображение пространственной организации димерной молекулы лектина. СНО — место локализации углевода; широкие стрелки — β -сегментные участки

В настоящей статье представлены результаты работы по построению атомной модели комплекса лектина гороха с углеводом (иодзамещенным производным глюкозы — бензил-2-ацетида-2,3-дидезокси-3-иод- α -D-глюкопиранозидом) при разрешении 2,4 Å. Следующая статья посвящена описанию структуры углеводсвязывающего центра и модели взаимодействия лектина с углеводом [16].

Лектин гороха — димер, состоящий из идентичных мономеров с молекулярной массой ~52 000 Да. Каждый мономер состоит из двух цепей — α и β , образованных в результате посттрансляционной модификации, и содержит по одному иону Ca и Mn и один углеводсвязывающий центр. Белок кристаллизуется из раствора в этиловом спирте в пространственной группе $P2_12_12_1$ с параметрами элементарной ячейки $a = 51,0$, $b = 61,7$, $c = 137,6$ Å. Результаты по определению структуры этого белка методом изоморфного замещения при разрешении 3 Å с установлением хода полипептидной цепи были описаны ранее [13].

Димерная молекула лектина имеет форму вытянутого эллипсоида с размерами $80 \times 40 \times 30$ Å. Схематическое изображение пространственной организации димерной молекулы лектина представлено на рис. 1. По аналогии с Con A β -супервторичная структура каждого мономера включает в себя два основных β -слоя. Первый слой (задний на рис. 2), почти плоский, состоит из 6 антипараллельных β -сегментов, второй (передний) — из 7 антипараллельных β -сегментов и заметно изогнут. Следует отметить, что участки цепи, являющиеся продолжениями трех сегментов уплощенного β -слоя (слева на рис. 1 и 2) и заметно отклоняющиеся от плос-

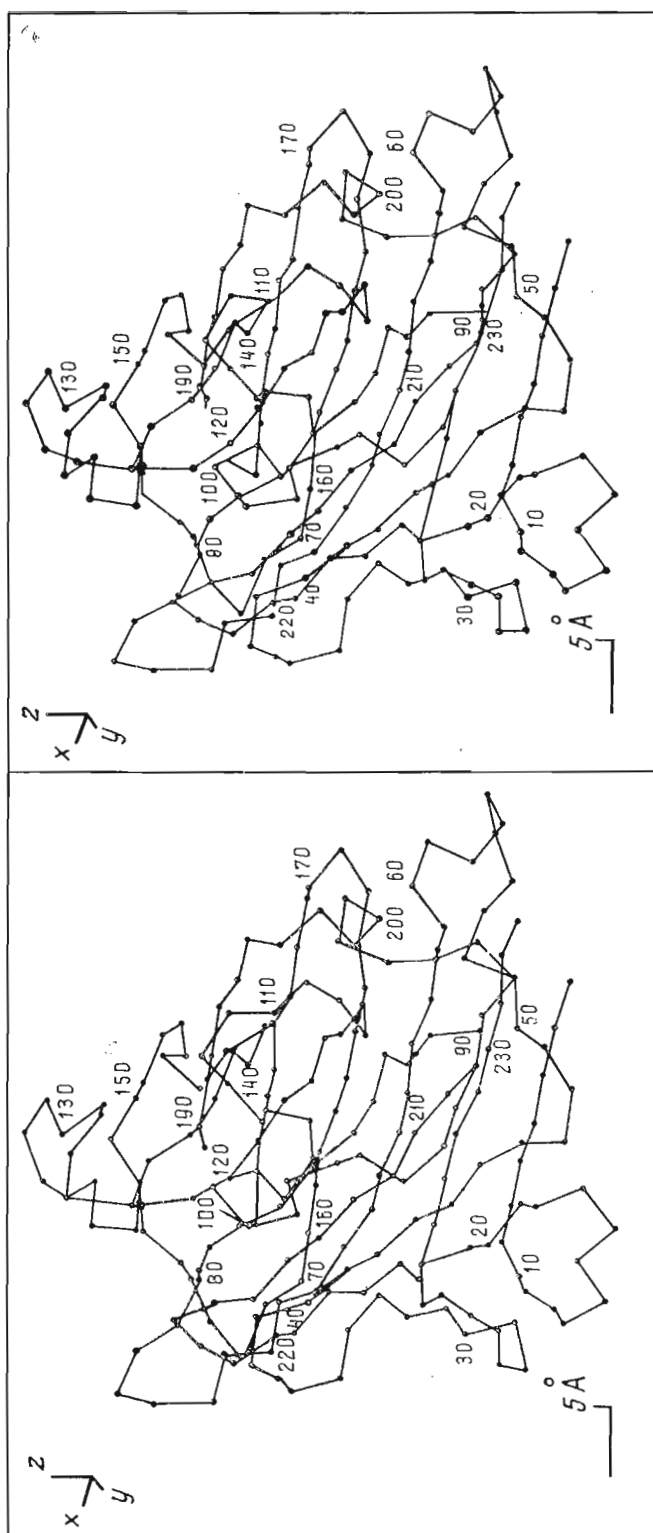


Рис. 2. Стереонизображение C^α -углеродного скелета мономера лектина (вид со стороны изогнутого слоя)

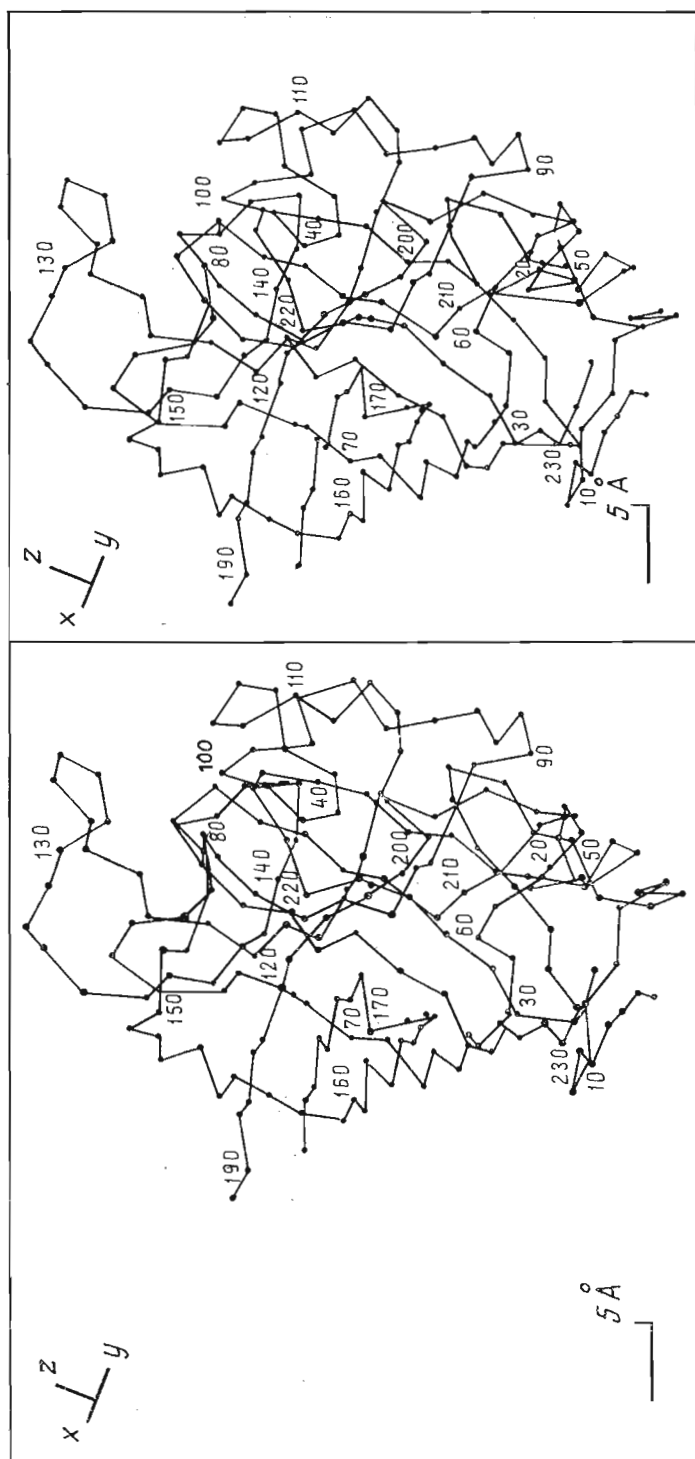


Рис. 3. Стереизображение C^α -углеродного скелета мономера лектина (вид со стороны дополнительного пятизвенчатого β -слоя)

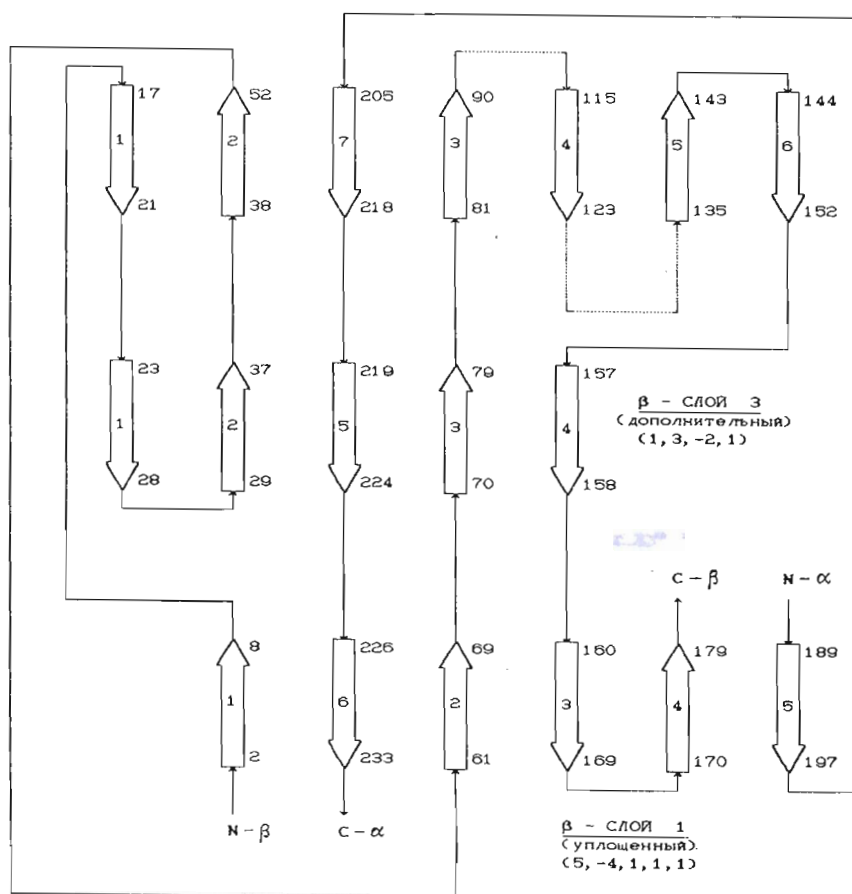
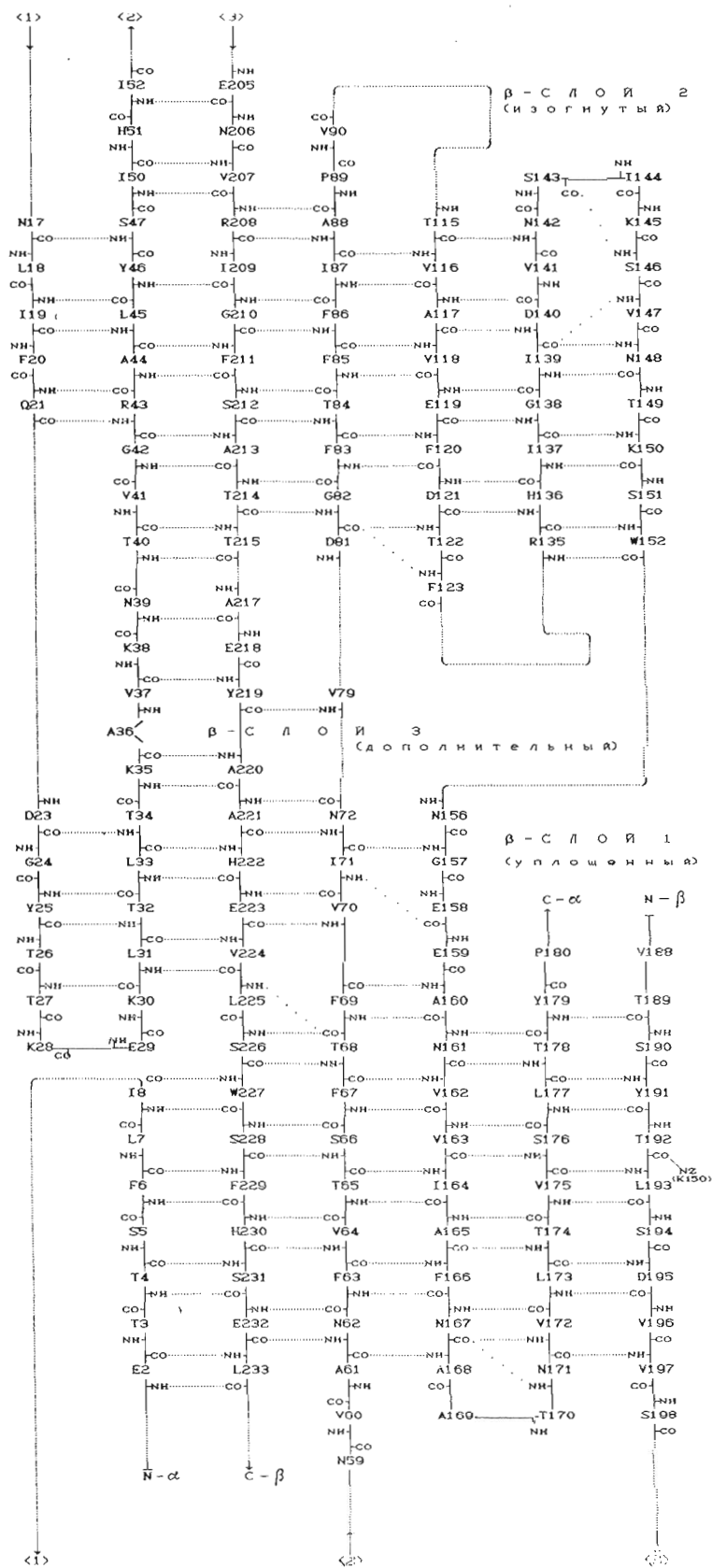


Рис. 4. Топологическая схема структурной укладки мономера лектина. β -Сегменты изображены широкими стрелками, внутри которых цифрами дана нумерация β -сегментов в индивидуальном слое, отвечающая ходу полипептидной цепи. Числа рядом обозначают номера начальных и конечных аминокислотных остатков в сегменте. Типы топологических мотивов β -слоев (по системе Дж. Ричардсон [17]) указаны в скобках. $N-\alpha$, $C-\alpha$, $N-\beta$, $C-\beta$ — N- и C-концы α - и β -цепей мономера лектина

кости слоя, также находятся в β -конформации. В структуре мономера *Con A* дополнительно присутствует двухсегментная β -шпилька, не взаимодействующая с остальными элементами β -структуры. В случае лектина гороха эта β -шпилька также сохраняется. При этом следующий за сегментом 29—32 шпильки участок полипептидной цепи 33—38 в отличие от соответствующего участка *Con A* принимает β -конформацию и пристраивается к упомянутым трем β -тяжам. Таким образом формируется третий, дополнительный β -слой, состоящий из пяти антипараллельных сегментов: три из них — продолжения β -сегментов плоского слоя, два других — сегменты удлиненной по сравнению с *Con A* β -шпильки. То есть, в лектине гороха в отличие от *Con A* дополнительно имеется третий неидеальный пятисегментный β -слой, расположенный почти перпендикулярно к уплощенному β -слою и параллельно к краевой части изогнутого слоя (рис. 3). Такое взаимное расположение слоев в супервторичной структуре лектина обеспечивает эффективное экранирование внутреннего гидрофобного ядра мономера.

Топологическое изображение структурной укладки мономера показано на рис. 4. Любопытно, что топологические мотивы первого и второго слоев, если не учитывать первый сегмент второго слоя, совпадают. Как показано в работе [4], лектин синтезируется как предшественник в так



называемой пре-про-форме, имеющей дополнительный участок полипептидной цепи, который предшествует N-концу лектина. Этот лидерный участок, состоящий из 30 аминокислотных остатков, удаляется в ходе трансляции цепи. Можно предположить, что отдельный фрагмент этого участка мог бы принять β -конформацию и пристроиться к первому сегменту первого β -слоя. Анализ аминокислотной последовательности лидерного участка не исключает такой возможности. В таком случае топологические мотивы первого и второго β -слоев в пре-про-форме лектина оказались бы просто тождественными. Кроме того, в предшественнике лектина имеется петлевой участок цепи 182—187, который позже удаляется в ходе посттрансляционной модификации. Этот участок, соединяющий четвертый и пятый сегменты уплощенного β -слоя, пространственно сближен с четвертым сегментом дополнительного β -слоя (рис. 2 и рис. 4), что не исключает возможности расширения пятисегментного слоя в лектине до семисегментного в предшественнике при условии, что этот участок в нем находится в форме β -шпильки. В таком гипотетическом случае в молекуле предшественника все три β -слоя являлись бы семисегментными и описывались одним и тем же топологическим мотивом (1,5,—4,1,1,1). Эта возможность могла бы реализоваться в гомологичных белках, особенно с более длинным петлевым участком.

Схема локализации внутримолекулярных водородных связей в β -супервторичной структуре углеводного комплекса лектина изображена на рис. 5.

Внутреннее гидрофобное ядро каждого мономера достаточно объемное и располагается между двумя основными β -слоями. Оно сформировано из плотно упакованных боковых цепей 56 аминокислотных остатков: фенилаланина (12 остатков), валина (10), изолейцина (9), лейцина (8), аланина (6), глицина (4), триптофана (3), треонина (2), а также гистидина (1) и тирозина (1).

Интересная особенность пространственной структуры лектина — наличие негидрофобной полости в каждом мономере. Она располагается с внешней (вогнутой) стороны изогнутого β -слоя и частично экранирована петлевыми участками полипептидной цепи (рис. 2). В основном это участок цепи 89—114, формирующий протяженную петлю характерной формы, которая повторяется во всех гомологичных лектину белках с известной пространственной структурой, например в Con A, флавине, причем в Con A эта петля сохраняет форму, несмотря на разрыв в ней. В мономере лектина эта полость заполнена боковыми цепями 23 аминокислотных остатков, из которых 9 неполярных, 8 полярных незаряженных, 4 кислотных и 2 основных.

В структуре димера мономеры связаны приближенной некристаллографической осью симметрии 2-го порядка. При этом шестисегментные β -слои каждого мономера пристраиваются друг к другу, образуя один протяженный слой из 12 антипараллельных сегментов, выстилающий «заднюю» часть димерной молекулы, а расположенные «спереди» семисегментные β -слои завершают образование неидеальной сэндвичевой архитектуры молекулы. Анализ показал, что основные структурные мотивы в молекуле лектина гороха и в димере Con A совпадают. На рис. 6 показана схема межмономерных контактов, стабилизирующих структуру димерной молекулы лектина. Основной вклад здесь вносят водородные связи между первыми сегментами уплощенных слоев в каждом мономере, а именно между NH- и CO-группами основных цепей двух мономеров (остатки Thr³, Ser⁵ и Leu⁷), а также между OH-группами боковых цепей остатков Tyr⁴⁶ и Ser⁴⁸.

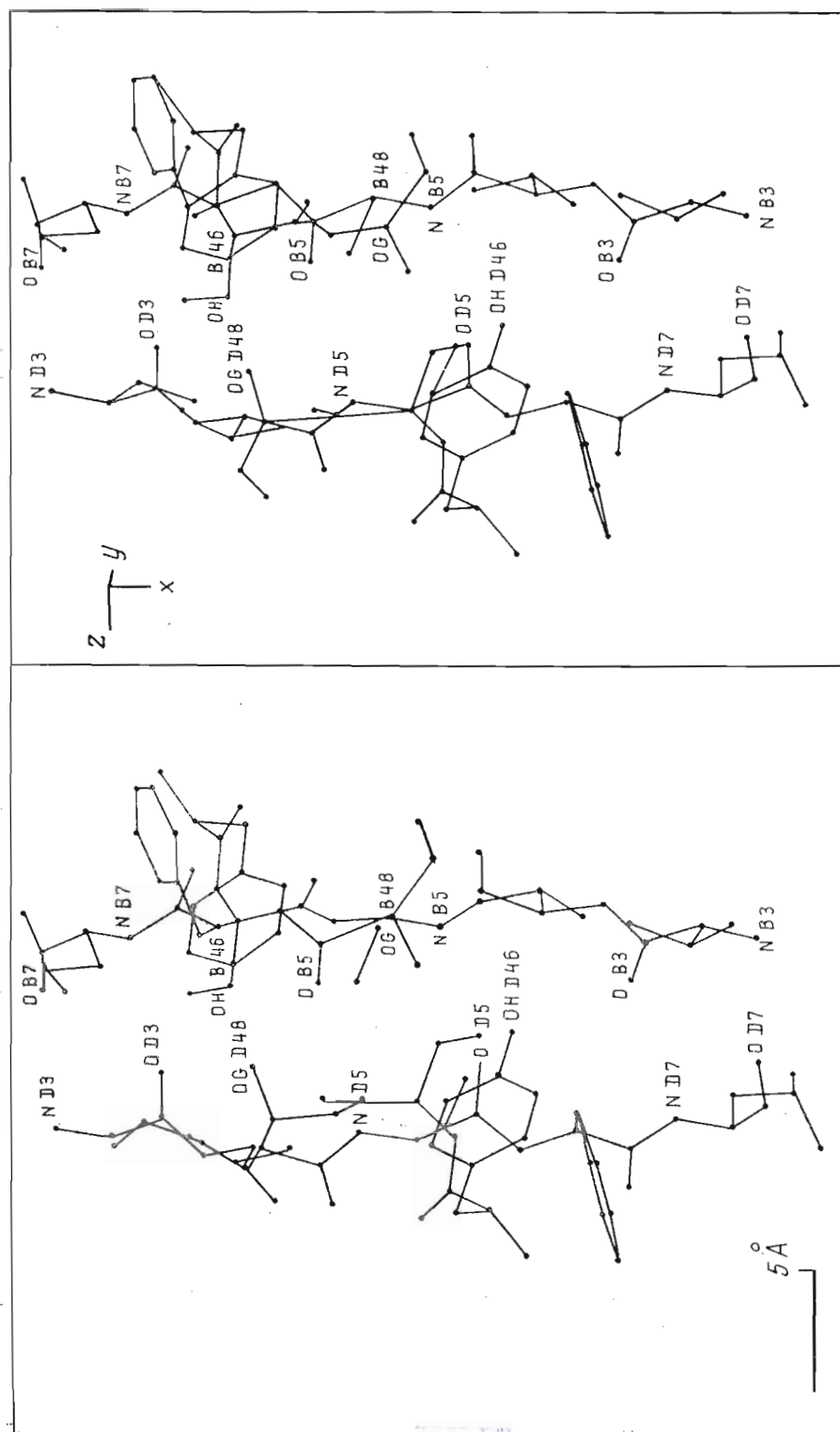


Рис. 6. Стереизображение области межмономерных контактов в лектине

Экспериментальная часть

Работа по установлению пространственной структуры лектина гороха на атомном уровне на первом этапе проводилась на ЭВМ «NOVA-3/12» с помощью компьютерной графической системы «Hewlett-Packard» на базе программного комплекса «ISOCUB» [18], позволяющего вписывать на экране графического дисплея фрагменты полипептидной цепи в изображение электронной плотности. Однако невысокое качество карт электронной плотности вследствие ограниченного числа изоморфных производных при разрешении 3 Å позволило однозначно локализовать лишь 40% неводородных атомов белка.

Для улучшения качества и повышения разрешения синтезов электронной плотности был использован метод смешанной модели с фиктивными атомами, реализованный на ЭВМ ЕС-1055 в программном комплексе «FROG» [19]. При этом повышение разрешения до 2,4 Å позволило определить координаты 66% неводородных атомов белка, в основном регулярной его части. Участки молекулы на петлях, соединяющих β -сегменты, а также участки, расположенные на поверхности молекулы, включая район углеводсвязывающего центра, интерпретировались на картах электронной плотности неоднозначно и поэтому на данном этапе построены не были.

Следующий этап включал в себя построение модели белка (из стержневых моделей Кендрью, масштаб 2 см/Å) с помощью оптического компаратора Ричардса. Плохо разрешенные (главным образом нерегулярные) участки белка строили исходя из гомологий с Соп А с учетом возможности образования внутримолекулярных водородных связей и с последующей оптимизацией конформации таких участков с помощью разработанного нами на основе алгоритма Пурисимы и Шераги [20] подхода к определению энергетически оптимальной конформации фрагмента белковой цепи по экспериментальным координатам C^α -атомов. Подход, реализованный в программном комплексе «IMAGE» [21], включал в себя процедуру генерации ограниченного набора возможных конформационных состояний, проходящих через известные C^α -положения, с последующей минимизацией общей потенциальной энергии. Структуру отдельных участков после сопоставления полученных конформаций с соответствующими изображениями электронной плотности приходилось корректировать и вторично оптимизировать.

Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам Института белка АН СССР Ю. Н. Чиргадзе, Н. А. Курочкиной и Н. А. Невской за консультационную помощь в работе с программным комплексом «ISOCUB». Авторы благодарят Д. Г. Васильева (ИМБ АН СССР) за любезное предоставление средств компьютерной графики для выполнения рисунков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ляхтин В. М. // Итоги науки и техники. Серия «Биотехнология». 1987. Т. 2.
2. Diaz C. L., Melchers L. S., Hooykaas P. J. J., Lugtenberg B. J. J., Kijne J. M. // Abstracts. 11th International lectin conference. 1989. Tartu. P. 16.
3. Косенко Л. В., Ковалевская Т. М. // Уч. зап. Тартуск. ун-та. 1989. Т. 2. С. 17—24.
4. Higgins T. J. V., Chandler P. M., Zurawski G., Button S. C., Spencer D. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. № 15. P. 9544—9549.
5. Riskulov R. R., Dobrokhotova Z. D., Kuzev S. V., Lobsanov Yu. D., Lubnin M. Yu., Mokulskaya T. D., Myshko G. E., Proskudina L. T., Rogacheva M. M., Saprykina L. F., Khrenov A. A., Mokulskii M. A. // FEBS Lett. 1984. V. 165. № 1. P. 97—101.
6. Einspahr H., Parks E. H., Suguna K., Subramanian E., Suddath F. L. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 35. P. 16518—16527.
7. Reeke G. N., Jr., Becker J. M. // Science. 1986. V. 234. № 4780. P. 1108—1111.
8. Van Wauwe J. P., Loontjens F. G., De Bruyne C. K. // Biochim. et biophys. acta. 1975. V. 379. P. 456—461.
9. Kornfeld K., Reitman M. L., Kornfeld R. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 13. P. 6633—6640.
10. Bhattacharyya L., Ceccarini C., Lorenzoni P., Brewer C. F. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. № 3. P. 1288—1293.

11. Becker J. W., Reeke G. N., Jr., Wang J. L., Cunningham B. A., Edelman G. M. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 4. P. 1513—1524.
12. Derewenda Z., Yariv J., Helliwell J. R., Kalb (Gilboa) A. J., Dodson E. J., Papiz M. Z., Wan T., Campbell J. // EMBO J. 1989. V. 8. № 8. P. 2189—2193.
13. Рисулов Р. Р., Кузев С. В., Лобсанов Ю. Д., Лубнин М. Ю., Мокульская Т. Д., Мокульский М. А. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 292. № 2. С. 486—490.
14. Rini J. M., Hardman K. D., Einspahr H., Suddath F. L., Carver J. P. // Abstracts. Annual meeting of Amer. crystallogr. assoc. Seattle. USA. 1989. V. 4.
15. Лобсанов Ю. Д., Кузев С. В., Рисулов Р. Р., Рыскин А. И., Плетнев В. З., Мокульский М. А. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 11. С. 1550—1552.
16. Лобсанов Ю. Д., Плетнев В. З., Мокульский М. А. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 12. С. 1599—1605.
17. Richardson J. S. // Adv. Prot. Chem. 1981. V. 34. P. 167—339.
18. Невская И. А., Курочкина И. А., Чиргадзе Ю. Н. // Кристаллография. 1986. Т. 31. № 2. С. 303—311.
19. Urzhumtsev A. G., Lunin V. Yu., Vernostova E. A. // J. Appl. Cryst. 1989. V. 22. № 5. P. 500—506.
20. Purisima E. O., Scheraga H. A. // Biopolymers. 1987. V. 23. № 7. P. 1207—1224.
21. Лубнин М. Ю., Плетнев В. З. // Кристаллография. 1990. Т. 35. Вып. 2. С. 307—311.

Поступила в редакцию
18.IV.1990

Yu. D. LOBSANOV, V. Z. PLETNEV, N. N. VTYURIN, M. Yu. LUBNIN,
M. A. MOKULSKII, A. G. URZHUMTSEV*, V. Yu. LUNIN*, T. B. LUZYANINA*

X-RAY STUDY OF THE PEA LECTIN-CARBOHYDRATE COMPLEX AT 2.4 Å RESOLUTION. I. ATOMIC MODEL

Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR; Moscow;
* *Research Computing Centre, Academy of Sciences of the USSR,*
Pushchino, Moscow Region

Three-dimensional structure of the pea lectin-carbohydrate complex has been determined at the atomic level. The dimeric molecule consists of identical monomers. The important feature of each monomer is a well-developed β -structure consisting of two basic antiparallel β -sheets (a flat 6-stranded and a curved 7-stranded) and an additional non-ideal 5-stranded antiparallel β -sheet. The orientation of the third sheet is normal to the flat one and parallel to the peripheral part of the curved one. Such an arrangement of β -sheets in supersecond structure allows for the effective covering of the interior hydrophobic core, which is formed by the side chains of 56 amino acid residues per monomer. The structure of the dimeric molecule is stabilized by a number of intermonomer hydrogen bonds and salt bridges.