



УДК 577.112.7.088.52

© 1990 г.

Ю. Д. Лобсанов, В. З. Плетнев, М. А. Мокульский

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПЛЕКСА
ЛЕКТИНА ИЗ ГОРОХА С УГЛЕВОДОМ ПРИ РАЗРЕШЕНИИ 2,4 Å
II. МЕТАЛЛ- И УГЛЕВОДСВЯЗЫВАЮЩИЙ ЦЕНТРЫ. МОДЕЛЬ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛЕКТИНА С УГЛЕВОДОМ

Институт молекулярной генетики АН СССР, Москва

Методом рентгеноструктурного анализа определена пространственная организация металл- и углеводсвязывающего центров лектина гороха. Первая координационная сфера иона Mn в белке составлена из следующих лигандов: кислороды карбоксильных боковых групп Glu¹¹⁹, Asp¹²¹, Asp¹²⁹, азот имидазола His¹³⁶ и кислороды двух молекул воды, дополняющие координацию иона до октаэдрической. Ион Ca координируют белковые лиганды: кислороды карбоксилатов боковых групп Asp¹²¹, Asn¹²⁵, Asp¹²⁹, карбонил основной цепи Phe¹²³ и кислороды двух молекул воды. Седьмой лиганд — OD1 (Asp¹²¹), являющийся лигандом и для Mn, слегка нарушает идеальность октаэдрической координации иона Ca. Молекула сахара (бензил-2-ацетамидо-2,3-дидезокси-3-иод- α -D-глюкопиранозид) связывается белком в небольшой полости на поверхности вблизи металлсвязывающего центра. При этом две водородные связи соединяют кислородные атомы O4 и O6 глюкозида соответственно с молекулой воды, координирующей ион Ca, и с NH-группой основной цепи Ala¹²⁷. Часть пиранозного кольца в плоскости атомов C3, C4, C5, имеющая неполярный характер, вступает в псевдостэкинг-взаимодействие с ароматическими кольцами боковых цепей Phe¹²³ и Tyr¹⁰⁰. В случае нативного глюкозида предполагается, что атом O3 дополнительно формирует две водородные связи с CO-группой *цис*-пептида Ala⁸⁰—Asp⁸¹ и с OD1(Asp⁸¹). Область связывания моносахарида располагается в середине стопки из шести ароматических боковых групп (Tyr⁷⁷, Tyr¹²⁴, Phe¹²³, Tyr¹⁰⁰, Trp¹²⁸ и Tyr¹⁰⁰), что указывает на гипотетическую возможность участия этих групп в формировании протяженной олигосахаридсвязывающей области с предпочтительностью к биантенным олигосахаридам. Представленная модель связывания углевода лектином гороха находится в хорошем согласии с данными биохимических исследований, анализ которых приводится.

Среди большого числа углеводсвязывающих белков лектины занимают особое место. Обращает на себя внимание их широкая распространенность в живой природе. Они обнаружены на всех уровнях развития живого — от бактерий и вирусов до человека, что свидетельствует о важной роли этих белков в процессах жизнедеятельности. Так называемая лектиновая активность, т. е. свойство агглютинировать клетки и/или преципитировать гликоконъюгаты, основывается на способности лектинов связывать обратимо углеводы без нарушения их ковалентной структуры. Как показали биохимические исследования [1, 2], взаимодействие лектинов с углеводами носит избирательный, специфический характер. По существующим классификациям, лектины разделяют на несколько групп по моносахаридной специфичности [3], в пределах которых они разбиваются на подгруппы в соответствии с тонкой специфичностью к олигосахаридам [4]. Лектины, принадлежащие к одной группе или подгруппе, различаются по величинам констант связывания различных производных моносахаридов и олигосахаридов. Здесь накоплен большой экспериментальный материал, характеризующий тонкую избирательность различных лектинов по отношению к углеводам [5—7]. Таким образом, лектины в совокупности как класс белков проявляют себя в широчайшем диапазоне углеводной специ-

Обозначения атомов в аминокислотных остатках даны в соответствии с номенклатурой: Protein Data Bank, Department of Chemistry, Brookhaven National Laboratory, N. Y.: Associated Universities Inc., Upton, L. I., 1973.

фичности. Изучение пространственной организации лектинов как целого и их углеводсвязывающих центров подготавливает необходимую базу для изучения структурных аспектов белок-углеводного взаимодействия. Очень ценную информацию здесь может дать изучение и сравнение стереохимических особенностей углеводсвязывающих центров у лектинов, принадлежащих как к одной группе или подгруппе специфичности, так и к разным.

Лектин гороха включают в одну группу специфичности с такими гомологичными ему лектинами, как Con A, лектины конских бобов (фавин), чечевицы и др. Лектины этой группы характеризуются избирательностью связывания глюкозы и маннозы и являются Ca, Mn-связывающими белками. Ряд исследований [8—10] свидетельствует о том, что эти ионы необходимы для углеводного связывания. Для указанных лектинов и ряда лектинов из других групп специфичности определена аминокислотная последовательность. При этом сравнительный анализ выявляет интересный факт наличия гомологии аминокислотных последовательностей глюкозо-, маннозо- и галактозоспецифических лектинов (например, из лимской фасоли, сои и др.) [11, 12].

К настоящему времени проведена локализация и определены предварительные характеристики углеводсвязывающих центров в Con A [13], фавине [14] и лектине гороха [15].

В предыдущей работе описана атомная модель углеводного комплекса лектина гороха, построенная при разрешении 2,4 Å [16].

В настоящей статье представлены результаты структурных исследований стереохимических особенностей металл- и углеводсвязывающих центров комплекса лектина гороха при разрешении 2,4 Å.

Полученные данные о пространственной организации металлсвязывающего центра в молекуле лектина гороха (рис. 1) показывают, что координация ионов Ca и Mn в лектине аналогична координации этих ионов в Con A (практически все лиганды, участвующие в связывании ионов, те же). Консервативность этой области подтверждает важную роль металлсвязывающего центра в функционировании этих белков. В координации иона Mn участвуют следующие лиганды белка: OE2(Glu¹¹⁹), OD1(Asp¹²⁴), OD1(Asp¹²⁹), NE2(His¹³⁶). Сюда же, по-видимому, так же как в Con A, включены две молекулы воды, дополняющие координацию иона до октаэдрической. Координационная сфера иона Ca также октаэдрическая. Она образована лигандами — OD2(Asp¹²⁴), O(Phe¹²³), OD1(Asn¹²⁵), OD2(Asp¹²⁹), а также двумя молекулами воды. Седьмой лиганд — OD1(Asp¹²⁴), который также является лигандом для Mn, слегка нарушает идеальность октаэдрической координации иона Ca. Одна из молекул воды, координирующих ион Ca, образует водородную связь с OD2(Asp⁸¹), но в отличие от Con A [17] находится слишком далеко от CO-группы основной цепи остатка Asp⁸¹ для образования с ней водородной связи.

Металлсвязывающий центр находится в глубине узкой полости, на входе в которую располагаются остатки с полярными или отрицательно заряженными боковыми группами (Thr¹²², Ser¹³¹, Asn¹³², Asp¹³⁴, Thr¹⁴⁹, Ser¹⁵¹), а также кислороды карбонильных групп полипептидного остова остатков Asp¹²⁹, Ser¹³¹, Arg¹³³, Val¹⁴⁷, Thr¹⁴⁹. По-видимому, такое расположение отрицательных зарядов на поверхности и внутри полости создает градиент отрицательного потенциала, способствующий специфическому связыванию положительных ионов Ca и Mn.

Как и в Con A, в молекуле лектина гороха пептидная связь, соединяющая остатки Ala⁸⁰, Asp⁸¹ (Ala²⁰⁷, Asp²⁰⁸ в Con A), принимает *цис*-конфигурацию, что указывает на важную структурно-функциональную роль этого редкого для белков (в случае непролиновых остатков) конформационного состояния.

Ранее [15] локализовано место посадки углевода на молекуле лектина по картам разностного синтеза электронной плотности при разрешении 3 Å.

На картах электронной плотности углеводного комплекса лектина, построенных при разрешении 2,4 Å, в месте локализации углевода имеется

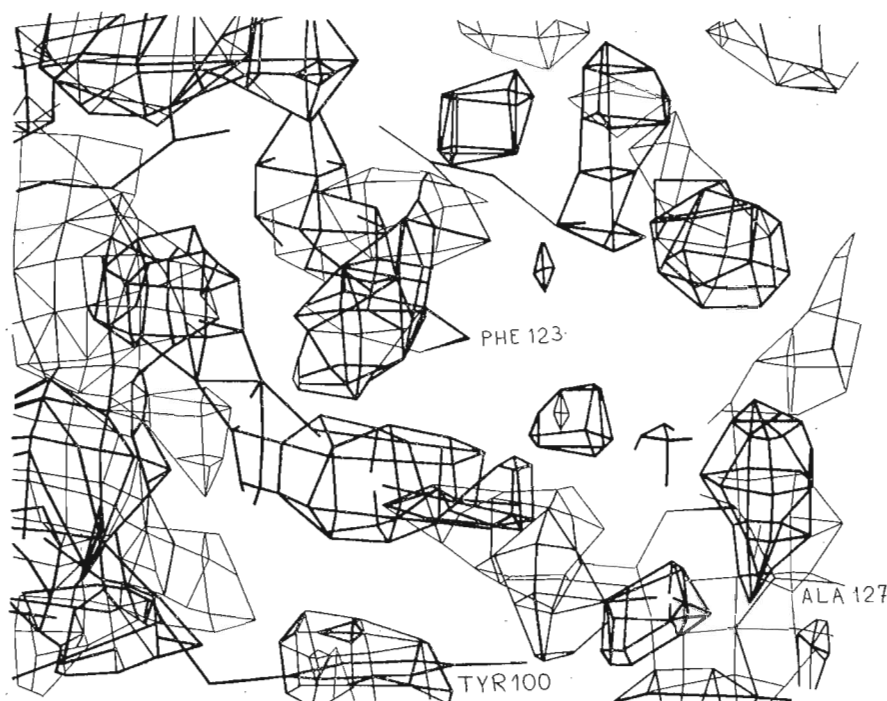


Рис. 2. Изображение фрагмента карт электронной плотности углеводного комплекса лектина. В центре рисунка в окружении остатков белка располагается плотность, отсутствовавшая на картах нативного лектина и соответствующая углеводу

плотность, отсутствующая на картах нативного белка. На рис. 2 она показана в окружении аминокислотных остатков, образующих углеводсвязывающий активный центр лектина. Молекула углевода (бензил-2-ацетамидо-2,3-дидезокси-3-под- α -D-глюкопиранозид) была вписана в эту плотность так, чтобы локализованный по разностному синтезу Фурье атом пода отвечал точке с координатами $x = 0,7$, $y = 0,57$, $z = 0,81$ (в долях ячейки). Из всех возможных вариантов ориентации глюкозида наилучшей оказалась та, при которой плоскость атомов C3, C4, C5 глюкопиранозы (в конформации кресла *C1*) примерно параллельна плоскостям ароматических боковых групп остатков Phe¹²³ и Tyr¹⁰⁰ (рис. 3). При этом для данного производного глюкозида электронная плотность, соответствующая его ароматической части, на картах отсутствует, что свидетельствует, по-видимому, о высокой подвижности этой части глюкозида в составе комплекса. При указанном расположении глюкопиранозы в углеводсвязывающем центре белка возможно образование водородных связей между гидроксильной группой сахара OH-4 и молекулой воды, координирующей ион Са, а также между OH-6 сахара и NH-группой основной цепи остатка Ala¹²⁷. Здесь следует отметить, что таким образом молекула воды, формирующая диполь-ионную связь с Са, образует также две водородные связи: с OD2(Asp⁸¹) и с гидроксидом OH-4 глюкозы.

Атом пода (замещающий гидроксильную группу OH-3 моносахарида) располагается в непосредственной близости от *цис*-пептидной группы Ala⁸⁰ — Asp⁸¹. Анализ показал, что в случае нативного глюкозида гидроксил OH-3 может образовывать водородные связи с группой OD1 (Asp⁸¹), а также с СО-группой *цис*-пептида Ala⁸⁰ — Asp⁸¹, что осуществимо только при *цис*-конфигурации данного пептидного звена молекулы. Это свидетельствует о том, что *цис*-конфигурационное состояние данной пептидной связи в лектине гороха является важным элементом организации углеводсвязывающего центра, обеспечивающим необходимую специфичность белка именно к глюкозе и маннозе.

При данном расположении функциональных группировок при углеводных атомах C3, C4, C5 (рис. 3) часть пиранозного кольца, лежащая

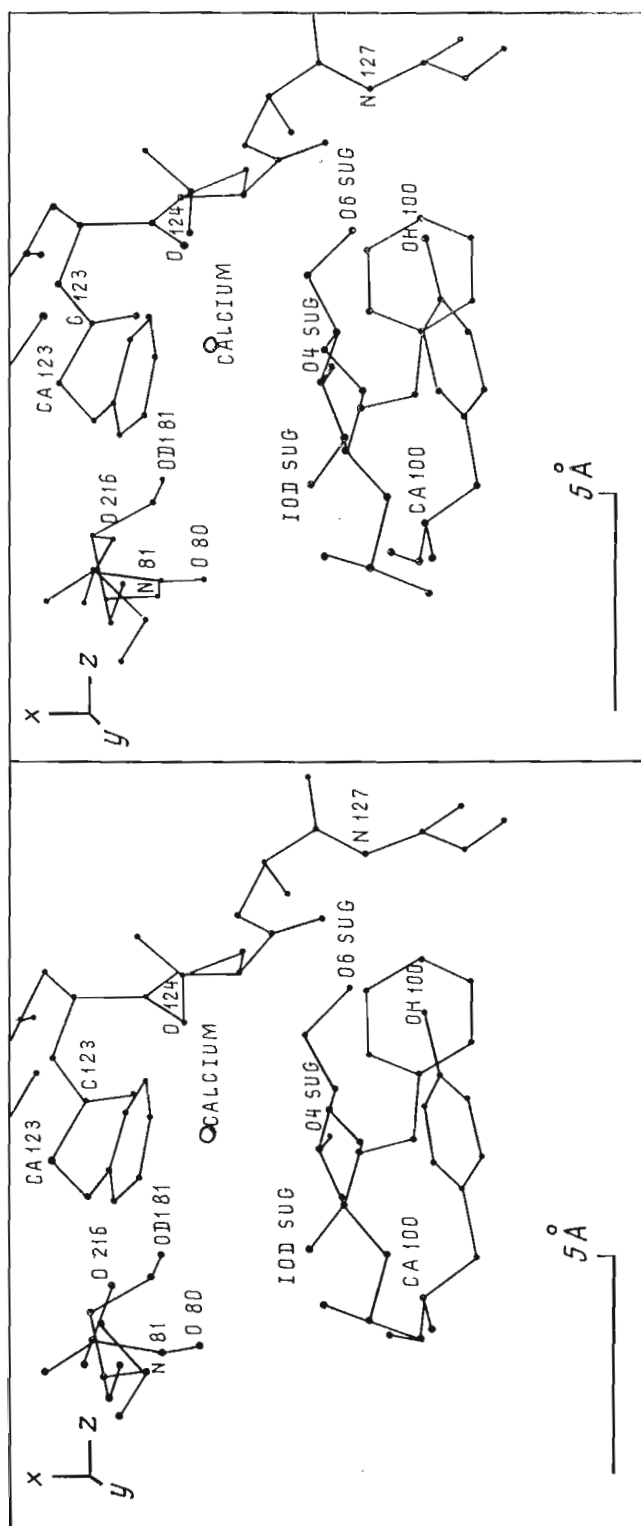


Рис. 3. Стереизображение области углеводсвязывающего центра лигнина гороха

в плоскости этих атомов, имеет неполярный характер. Таким образом, эта неполярная часть глюкозида, располагаясь между ароматическими кольцами боковых цепей Phe¹²³ и Tyr¹⁰⁰, образует с ними нечто вроде стэкинг-взаимодействия. Здесь необходимо отметить, что расположение аминокислотных остатков с ароматическими боковыми цепями на поверхности молекулы носит отнюдь не случайный характер. Анализ показал, что на поверхности молекулы (в пересчете на мономер) располагается около 140 аминокислотных остатков, подавляющее большинство которых имеют заряженные или полярные боковые цепи. В их число входят лишь 11 остатков с ароматическими боковыми цепями: шесть тирозинов, два гистидина, два триптофана, фенилаланин. Из них четыре остатка располагаются вблизи углеводсвязывающего центра: Phe¹²³, Tyr¹⁰⁰, Tyr¹²⁴ и Trp¹²⁸. Вместе с боковыми цепями остатков Tyr¹⁰⁹ и Tyr⁷⁷ их ароматические боковые цепи выстраиваются на поверхности мономера стопкой протяженностью ~30 Å, причем область связывания моносахарида располагается посередине этой стопки.

Таким образом, в связывание глюкозы лектином основной вклад вносят водородные связи, завязываемые атомами O3, O4 и O6 углевода, соответственно, с *цис*-пептидом и с OD1(Asp⁸¹), с молекулой воды (координирующей ион Ca) и с NH(Ala¹²⁷). Дополнительный вклад в связывание углевода вносит также ван-дер-ваальсово квазистэкинг-взаимодействие неполярной части пиранозного кольца с Phe¹²³ и Tyr¹⁰⁰. При этом атомы O1, O2, O5 глюкозы не участвуют в связывании.

Представленная модель связывания углевода лектином гороха находится в хорошем согласии с данными биохимических исследований, из которых вытекает, во-первых, что в связывании углевода важную роль играют ионы металлов. Действительно, как следует из модели, они стабилизируют пространственную укладку длинной нерегулярной петли 120—136, в которой находятся два лиганда, участвующих в связывании углевода (Phe¹²³ и Ala¹²⁷). Кроме того, ион Ca через молекулу воды осуществляет связь с гидроксилом OH-4 сахара.

Во-вторых, биохимические данные указывают на то, что 3-, 4- и 6-дезоксипроизводные глюкозы имеют почти на 2 порядка меньшую константу ассоциации с лектином, что находит полное объяснение в предложенной модели связывания, в которой именно эти гидроксилы осуществляют связывание с лигандами белка.

В-третьих, эксперименты по связыванию лектина с различными модификациями сахаров свидетельствуют, что 3-О-метильные и 3-О-бензольные производные глюкозы обладают наибольшим среди моносахаридов сродством к лектину. Этот факт можно объяснить наличием небольшой неполярной полости между *цис*-пептидом и фрагментами цепи 98—99 и 214—216. И метильная, и бензольная группы при атоме O3 производного хорошо вписываются в эту полость, что, по-видимому, усиливает связывание углевода за счет вытеснения молекулы воды из указанной полости и дополнительного ван-дер-ваальсова взаимодействия с неполярным окружением белка.

В-четвертых, известно, что константа связывания *D*-маннозы более чем в 2 раза превосходит константу связывания *D*-глюкозы. Этот факт в рамках предложенной модели можно объяснить следующим образом. Единственным отличием маннозы от глюкозы является конфигурационное различие в ориентации гидроксила OH-2. Этот гидроксил (рис. 3), характеризующийся в глюкозе экваториальным расположением, в составе комплекса не находит соответствующего белкового лиганда. Напротив, в случае маннозы аксиальное расположение OH-2 благоприятствует образованию водородной связи с СО-группой основной цепи остатка Gly²¹⁶, что увеличивает сродство лектина к маннозе по сравнению с глюкозой.

В-пятых, в случае галактозы, отличающейся от глюкозы ориентацией гидроксила OH-4, предложенная модель связывания уже не реализуется из-за отсутствия подходящего белкового лиганда для этого гидроксила и появления стерических затруднений с его размещением вблизи боковой цепи Phe¹²³. Это и объясняет факт отсутствия сродства к галактозе у лек-

тина гороха. По-видимому, у галактозоспецифических лектинов, имеющих структуру, гомологичную структуре глюкозо- и маннозоспецифических лектинов, углеводсвязывающий центр организован несколько иначе, о чем свидетельствует и наличие цистеина вместо Phe¹²³ в галактозоспецифическом лектине лимской фасоли [11]. Известно, что у этого лектина остаток цистеина играет важную роль в связывании углевода. При условии применимости в целом предложенной модели связывания и в случае галактозоспецифических лектинов возможно, что именно SH-группа цистеина координирует гидроксил ОН-4 галактозы в связывающем центре этих лектинов.

В-шестых, имеются данные о наибольшем сродстве лектинов вообще и лектина гороха в частности к олигосахаридам, в особенности к разветвленным, так называемым биантенным [18]. Расположение участка связывания моносахарида в середине стопки из шестипароматических боковых групп указывает на гипотетическую возможность участия этих групп в формировании протяженной олигосахаридсвязывающей области с предпочтительной избирательностью к биантенным олигосахаридам. При этом углеводное звено в точке ветвления олигосахарида, по-видимому, располагается в указанном участке связывания моносахарида.

Экспериментальная часть

Все модельные построения осуществляли с помощью стержневых моделей Кендрию (масштаб 2 см = 1 Å) на оптическом компараторе Ричардса.

Авторы благодарят Д. Г. Васильева (ИМБ АН СССР) за любезное предоставление средств компьютерной графики для выполнения рисунков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lis H., Sharon N. // *Annu. Rev. Biochem.* 1986. V. 55. P. 35—67.
2. Goldstein I. J., Poretz R. D. // *The Lectins/Eds Liener I. E., Sharon N., Goldstein I. J. Orlando, FL.: Acad. Press, 1986. P. 33—247.*
3. Makela O. // *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* 1957. V. 35. Suppl. 11. P. 1—156.
4. Gallagher J. T. // *Biosci. Reports.* 1984. V. 4. P. 621—632.
5. Kouchalakos R. N., Hapner K. D. // *Biochim. et biophys. acta.* 1984. V. 787. P. 237—243.
6. Kato G., Maruyama Y., Nakamura M. // *Plant and Cell Physiol.* 1981. V. 22. № 5. P. 759—777.
7. Van Wauwe J. P., Loontjens F. G., De Bruyne C. K. // *Biochim. et biophys. acta.* 1975. V. 379. P. 456—461.
8. Lönnerdal B., Borrebaeck C. A. K., Etzler M. E., Errson B. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1983. V. 115. № 3. P. 1069—1074.
9. Goldstein I. J., Hayes C. E. // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1978. V. 35. P. 127—340.
10. Shoham M., Kalb A. J., Pecht I. // *Biochemistry.* 1973. V. 12. № 10. P. 1914—1917.
11. Roberts D. D., Goldstein I. J. // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. № 2. P. 909—914.
12. Foriers A., Wuilmart C., Sharon N., Strosberg A. D. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1977. V. 75. № 4. P. 980—986.
13. 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.
14. Reeke G. N., Jr., Becker J. W. // *Science.* 1986. V. 234. № 4780. P. 1108—1111.
15. Лобсанов Ю. Д., Кузев С. В., Рисулов Р. Р., Рыскин А. И., Плетнев В. З., Мокульский М. А. // *Биоорганическая химия.* 1987. Т. 13. № 11. С. 1550—1552.
16. Лобсанов Ю. Д., Плетнев В. З., Виночин П. Н., Лубнин М. Ю., Мокульский М. А., Уржумцев А. Г., Лукин В. Ю., Лузянина Т. Б. // *Биоорганическая химия.* 1990. Т. 16. № 12. С. 1589—1598.
17. Hardman K. D., Agarwal R. C., Freiser M. J. // *J. Mol. Biol.* 1982. V. 157. P. 69—86.
18. Bhattacharyya L., Ceccarini C., Lorenzoni P., Brewer C. F. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. № 3. P. 1288—1293.

Поступила в редакцию
18.IV.1990

X-RAY STUDY OF THE PEA LECTIN-CARBOHYDRATE COMPLEX AT 2.4 Å
RESOLUTION. II. METAL- AND CARBOHYDRATE BINDING SITES.
A MODEL OF LECTIN-CARBOHYDRATE INTERACTION

Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The organization of the metal- and carbohydrate binding sites of pea lectin has been determined by the X-ray method. The first, octahedric coordination sphere of manganese ion is formed by the following ligands: carboxyl oxygens of the side chains of Glu¹¹⁹, Asp¹²¹, Asp¹²⁹, nitrogen atom of imidazole ring of His¹³⁶ and oxygen atoms of two water molecules. Calcium ion is coordinated by carboxyl oxygens of the side chains of Asp¹²¹, Asn¹²⁵, Asp¹²⁹, carbonyl oxygen of Phe¹²³, and two oxygens of water molecules. The seventh ligand, OD1 of Asp¹²¹, which is also ligand for Mn, slightly distorts ideality of octahedric coordination of calcium ion. The saccharide molecule (benzyl-2-acetamido-2,3-dideoxy-3-iodo- α -D-glucopyranoside) in C1 conformation is bound by the protein in a shallow cleft on the surface of the molecule near to the metal binding site. There are two hydrogen bonds connecting saccharide oxygens O4 and O6 with the Ca-coordinating water molecule oxygen and with the nitrogen atom of the Ala¹²⁷ amino group, respectively. The non-polar part of the pyranose ring lying in the plane of carbon atoms C3, C4, C5 forms pseudostacking interaction with aromatic side chains of Phe¹²³ and Tyr¹⁰⁰. In the case of the native saccharide, oxygen O3 presumably forms two more hydrogen bonds with carbonyl oxygen of *cys*-peptide Ala⁸⁹ — Asp⁸¹ and with carboxyl oxygen OD1 of Asp⁸¹. The saccharide binding site lies in the middle of the rouleau of six aromatic side chains of Tyr⁷⁷, Tyr¹²⁴, Phe¹²³, Tyr¹⁰⁰, Trp¹²⁸, and Tyr¹⁰⁹. It suggests that these groups form an extended oligosaccharide binding region with preference to the biantennary oligosaccharides. The proposed model of binding carbohydrates by the pea lectin molecule is in a good accordance with biochemical data.