



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.322(53+6):539.26

© 1993 Ю. Д. Лобсанов, В. З. Плетнев *

СТРУКТУРА УГЛЕВОДСОДЕРЖАЩЕГО КОМПЛЕКСА ЛЕКТИНА
ГОРОХА ПРИ РАЗРЕШЕНИИ 1,8 Å*Институт молекулярной генетики РАН, Москва;*** Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва*

Глюкозо- и маннозоспецифичный белок, лектин из гороха — димер с молекулярной массой ~ 52 кДа, состоящий из идентичных мономеров. Каждый мономер состоит из двух цепей α и β (6 и 20 КДа соответственно) и содержит по одному иону Ca^{2+} и Mn^{2+} и один углеводсвязывающий центр.

Ранее атомная модель лектина гороха в комплексе с иодзамещенным производным глюкозы — бензил-2-ацетиамидо-2,3-дидезокси-3-иод- α -D-глюкопиранозидом — была установлена рентгеновскими методами при разрешении 2,4 Å [1, 2]. В настоящем сообщении представлены результаты кристаллографического уточнения структуры комплекса с подключением экспериментальных данных более высокого разрешения — 1,8 Å.

Кристаллографическому уточнению структуры углеводсодержащего комплекса в данной работе предшествовало уточнение структуры нативного белка при разрешении 2,4 Å. Стартовая модель лектина была получена на оптическом компораторе Ричардса с использованием некристаллографической симметрии и последующей коррекцией методами компьютерной графики на основе программных комплексов «ISOCUB» [3] и FRODO [4]. Уточнение структуры производилось на ЭВМ ESV-50 и micro-VAX с помощью комплекса программ TNT [5] в несколько этапов с попеременной правой координат на графической станции. На одном из промежуточных этапов после уточнения температурного фактора ($R = 24\%$) было локализовано 277 молекул воды. Последующие 20 циклов уточнения координат и 5 циклов уточнения температурного фактора с двумя промежуточными коррекциями модели методами молекулярной графики привели к величине R -фактора 18%.

Далее уточнение было продолжено на базе экспериментальных данных, полученных для углеводсодержащего комплекса лектина. При разрешении 2,4 Å был построен разностный синтез с коэффициентами ($|F_{\text{ком}}| - |F_{\text{нат}}|$) и фазами для нативного белка. С помощью графических методов молекула сахара была вписана в отчетливо видную на синтезе электронную плотность с мощным пиком, соответствующим атому иода. При этом перераспределение плотности в районе связывающего центра свидетельствовало о том, что посадка сахара привела к вытеснению трех молекул воды, которые и были исключены из модели комплекса. Последующие 20 циклов уточнения с двумя правками на графической станции и 5 циклов уточнения температурного фактора при разрешении 2,4 Å привели к величине R -фактора 16%. После поэтапного подключения дифракционных

Таблица 1

Статистические характеристики геометрических параметров уточненной модели комплекса лектина с углеводом

Параметр	Число параметров	Ср.-кв. отклонение
Длина связи	3668	0,023 Å
Валентный угол	4999	3,8 Å
Торсионные углы	2087	15°
Планарные группы	528	0,02 Å ²
Невалентные контакты	26	0,02 Å

Таблица 2

Система специфических Н-связей сахара в углеводсвязывающем центре лектина

Донор	Акцептор	Расстояние, Å
O-4(Glc)	O ^{δ1} (Asp81)	2,51
O-4(Glc)	O ^{δ1} (Asn125)	3,54
NH(Gly99)	O-3(Glc)	3,41
N ^{δ2} H(Asn125)	O-4(Glc)	2,58
NH(Ala217)	O-5(Glc)	3,70
NH(Glu218)	O-6(Glc)	3,56

Таблица 3

Геометрия координационной сферы ионов Ca²⁺ и Mn²⁺ в металлсвязывающих центрах лектина*

Ca ²⁺		Mn ²⁺	
Атом	Å	Атом	Å
O ^{δ1} (Asp121)	2,55	O ^{ε1} (Glu119)	2,05
O(Phe123)	2,31	O ^{δ2} (Asp121)	2,11
O ^{δ1} (Asn125)	2,13	O ^{δ1} (Asp129)	2,46
O ^{δ2} (Asp129)	2,45	N ^{ε2} (His136)	2,46
O(W*1)	2,49	O(W3)	2,10
O(W2)	2,40	O(W4)	2,25

* W — обозначение молекулы воды; приведено расстояние между ионом металла и атомом ионсвязывающей группы белка.

данных до разрешения 2, а затем до 1,8 Å и проведения соответственно 10 и 15 циклов уточнения окончательная величина R-фактора при разрешении 1,8 Å составила 18%. Статистические данные по геометрии модели лектина сведены в табл. 1.

Уточненная при разрешении 1,8 Å структура комплекса лектина с производным бензилглюкопиранозиды (рис. 1) сохранила все основные черты, установленные при разрешении 2,4 Å [1, 2]. Полученные в настоящей работе результаты

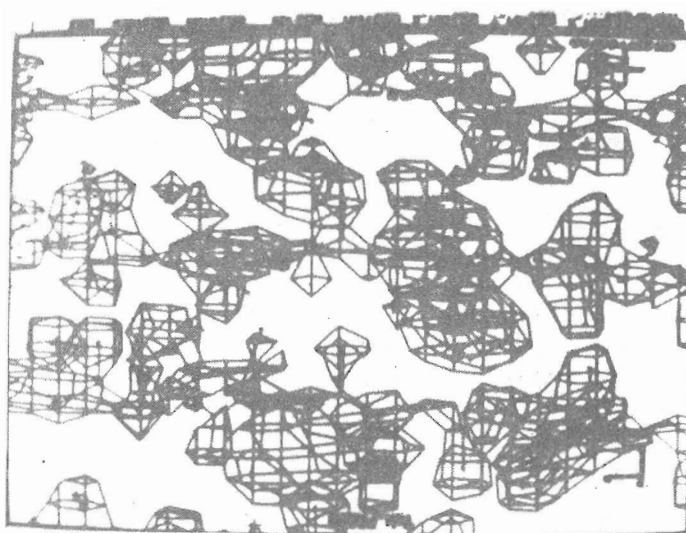


Рис 1. Фрагмент карты электронной плотности углеводсодержащего комплекса лектина при разрешении 1,8 Å с вписанными участками белковой цепи

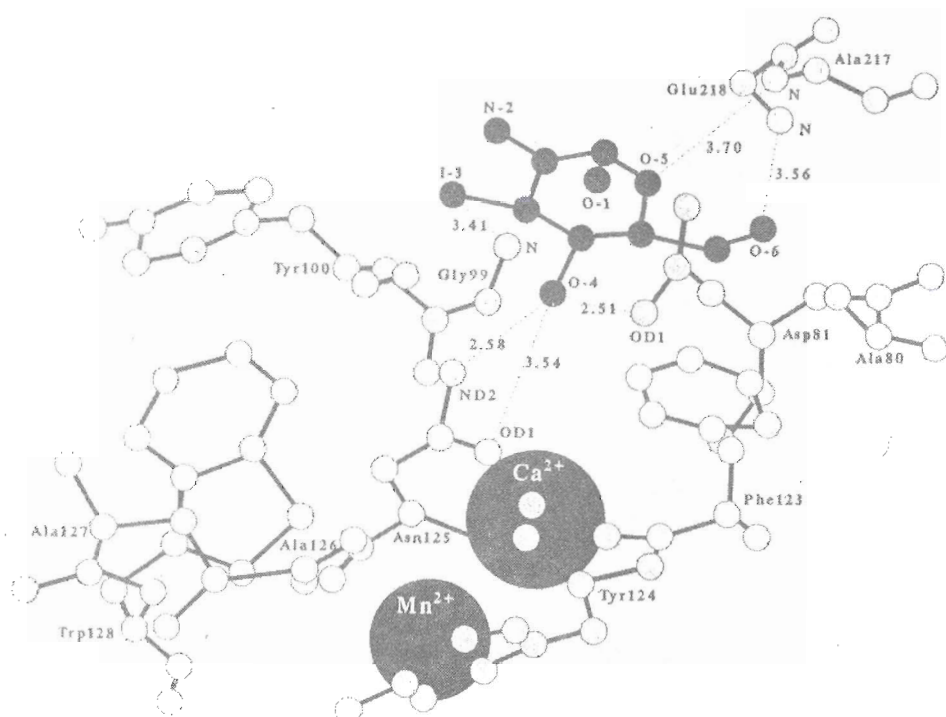


Рис. 2. Структура углевод- и металлосвязывающих центров лектина гороха. Черными кружочками показаны атомы сахарного остатка

отвечают лишь более тонкой детализации структурных особенностей комплекса. Это прежде всего относится к наиболее важным областям белковой глобулы — углевод- и металлосвязывающим центрам (рис. 2).

В табл. 2 и 3 суммированы структурные данные, касающиеся ближайшего окружения глюкозида, а также ионов Ca^{2+} и Mn^{2+} в белке. Связывающие группировки активных центров и их пространственное расположение относительно лигандов достаточно близко моделируют ситуацию, имеющую место у родственного белка — конканавалина А [6].

Углеводная специфичность лектина определяется прежде всего уникальной 3-мерной системой Н-связей (табл. 2). Основной вклад в образование Н-связей вносят соответствующие группы углевода в 3, 4, 5 и 6-м положениях. Группы в 1-м и 2-м положениях в связывании *D*-глюкозы не участвуют. Наоборот, в случае *D*-маннозы, отличающейся конфигурационной ориентацией ОН-2, создаются благоприятные условия для дополнительного Н-связывания данного гидроксила с СО-группой основной цепи остатка Gly216. Этим, по-видимому, и объясняется в 2,4 раза более высокая константа связывания *D*-маннозы по сравнению с *D*-глюкозой [7]. Дополнительный стабилизирующий вклад в связывание углевода вносит также ван-дер-ваальсово квазистэкинг-взаимодействие неполярной части пиранозного кольца с боковой цепью остатка Phe123.

Координация ионов Ca^{2+} и Mn^{2+} в металлосвязывающем центре лектина гороха достаточно консервативна и близка таковой у конканавалина А [6]. Октаэдрическое окружение каждого иона включает по 4 связывающие группы белка и по 2 молекулы воды (табл. 3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лобсанов Ю. Д., Плетнев В. З., Втюрин Н. 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.
2. Лобсанов Ю. Д., Плетнев В. З., Мокульский М. А. // *Биоорганическая химия*. 1990. Т. 16. № 12. С. 1599—1605.
3. Невская Н. А., Курочкина Н. А., Чиргадзе Ю. Н. // *Кристаллография*. 1986. Т. 31. № 2. С. 303—311.
4. Jones T. A. // *J. Appl. Crystallog.* 1978. V. 11. P. 268—272.
5. Thronrud et al. // *J. Appl. Crystallog.* 1983. V. 19. P. 115—120.
6. Derewenda Z., Yariv J., Helliwell J. R., Kalb A. J., Dodson E. J., Papiz M. Z., Wan T., Campbell J. // *EMBO J.* 1989. V. 8. № 8. P. 2189—2193.
7. Van Wauwe J. P., Loontjens F. G., De Bruyne C. K. // *Biochim. et biophys. acta.* 1975. V. 379. P. 456—461.

Поступило в редакцию
16.IX.1992

Yu. D. LOBSANOV, V. Z. PLETNEV*

THE STRUCTURE A CARBOHYDRATE-CONTAINING COMPLEX OF PEA LECTIN AT 1.8 Å RESOLUTION

Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow;

* *M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Crystallographic refinement of a complex of pea lectin with a monosaccharide derivative (benzyl-2-acetamido-2,3-dideoxy-3-iodo- α -*D*-glucopyranoside) has been carried out at 1.8 Å resolution up to $R=18\%$. Details of the 3D structure of the complex including the carbohydrate and Ca^{2+} , Mn^{2+} binding sites have been specified.