



УДК 547.96.02

**ПОЛУЧЕНИЕ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ НОВЫХ КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ
ЛЕКТИНА ГОРОХА С D-ГЛЮКОПИРАНОЗОЙ
И D-МАННОПИРАНОЗОЙ**© 1995 г. И. Ю. Михайлова, И. Н. Цыганник*, Ю. Д. Фонарев,
Ю. В. Куликов, В. З. ПлетневИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, ГСП-7, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступило в редакцию 12.01.95 г.

Ключевые слова: лектин гороха, кристаллический комплекс; рентгеноструктурный анализ.

Лектины – углеводсвязывающие белки неиммунной природы, агглютинирующие клетки и/или преципитирующие глюкоконъюгаты. Связывание углеводов лектинами происходит специфично и обратимо, без нарушения ковалентной структуры. Эти белки широко распространены в живой природе, но их функциональная роль остается пока малоизученной. Наиболее хорошо исследованы лектины семян овощных растений – гороха, чечевицы, конских бобов (фавин), канавалии мечевидной (конканавалин А), семян *Lathyrus ochrus* (LoL-изолектины). У лектинов этой группы выявлена тесная гомология по первичной и пространственной структурам (см. [1, 2] и цитируемые там работы). Очень интересным представляется выяснение природы тонких различий в углеводной специфичности лектинов [3 - 5]. Эффективность такого рода исследований существенно повышается при наличии детальной информации о трехмерной структуре комплексов лектинов с углеводами.

Объект настоящего исследования – лектин гороха (*Pisum sativum*) – принадлежит к группе маннозо- и глюкозоспецифичных Ca^{2+} , Mn^{2+} -содержащих лектинов (димер с молекулярной массой около 52 кДа). Структура одного из таких комплексов, полученного вымачиванием кристаллов свободного лектина гороха в растворе иодпроизводного глюкозы – бензил-2-ацетамидо-2,3-дидезокси-3-иод- α -D-глюкопиранозиды – установлена нами рентгеновскими методами с разрешением 1.8 Å [6]. При этом молекула углевода была обнаружена только в одном из двух связывающих цен-

тров димера белка с относительно низким коэффициентом заполнения [7]. Кроме того, замена в использованном производном глюкозы кислорода на иод в положении 3 не могла не привести к искажению структуры стабилизирующих водородных связей.

Для получения более точного представления о стереохимической организации активного центра нами была разработана методика приготовления качественных кристаллических комплексов лектина гороха с природными углеводами. Для выделения и очистки белка была использована незначительно модифицированная процедура, описанная в работе [8]. После заключительной стадии очистки белковый препарат в течение суток диализовали против большого количества бидистиллированной воды и концентрировали на мембранном фильтре до поглощения не менее 14 - 16 OE_{280} (около 10 мг/мл). При получении кристаллических углеводных комплексов с высокими коэффициентами заполнения обоих активных центров был использован метод сокристаллизации. К раствору белка добавляли в качестве осадителя этанол до концентрации 5 - 8% и избыток глюкозы или маннозы до концентрации около 60 мМ. После центрифугирования раствор помещали в стеклянный сосуд и выдерживали при 4°C в течение 1 - 2 нед до появления кристаллов. Аналогичный результат был получен при кристаллизации методом диализа относительно противораствора с этанолом (6 - 10%) и углеводом (60 мМ). Полученные обоими способами кристаллы со средними размерами 0.15 × 0.2 × 0.6 мм имели, как правило, призматическую форму и хорошую огранку.

* Автор для переписки.

Предварительные рентгеноструктурные исследования были проведены фотометодом на рентгеновском генераторе GX-6 (Elliott, Англия). Комплексы лектина как с глюкозой, так и с маннозой были получены в двух кристаллических формах, дающих дифракционное поле до разрешения 1.9 - 2.3 Å и отвечающих пространственной группе $P2_12_12_1$ с параметрами элементарных кристаллических ячеек a 62.8, b 135.3, c 54.8 Å и a 73.4, b 107.7, c 64.6 Å. Величина удельного парциального объема в предположении одной димерной молекулы на независимую часть ячейки (Z 4) составила соответственно 2.24 и 2.46 Å³/Да, что близко среднестатистическому значению для белковых кристаллов [9].

В настоящее время полученные кристаллы используются для рентгеноструктурных исследований пространственной организации углеводных комплексов с высоким разрешением.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yarwood A., Richardson M., Sousa-Cavada B., Rouge P. // FEBS Lett. 1985. V. 184. № 1. P. 104 - 109.
2. Rini J.M., Hardman K.D., Einspahr H., Suddath F.L., Carver J.P. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. № 14. P. 10126 - 10132.
3. Van Wawe J.P., Loontjens F.G., De Bruyne C.K. // Biochim. et biophys. acta. 1975. V. 379. P. 456 - 461.
4. Debray H., Decout D., Strecker G., Spik G., Montreuil J. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 117. P. 41 - 55.
5. Rogue P., Sousa-Cavada B. // Plant Sci. Lett. 1984. V. 37. № 1. P. 21 - 27.
6. Лобсанов Ю.Д., Плетнев В.З. // Биооргани. химия. 1993. Т. 19. № 1. С. 122 - 125.
7. Лобсанов Ю.Д., Кузев С.В., Рискулов Р.Р., Рыскин А.И., Плетнев В.З., Мокульский М.А. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. № 11. С. 1550 - 1552.
8. Trowbridge I.S. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. № 18. P. 6004 - 6012.
9. Matthews B.W. // J. Mol. Biol. 1968. V. 33. P. 423 - 441.

Preparation and Preliminary X-Ray Diffraction Analysis of New Crystalline Complexes of Pea Lectin with *D*-Glucopyranose and *D*-Mannopyranose

I. Yu. Mikhailova, I. N. Tsygannik*, Yu. D. Fonarev,
Yu. V. Kulikov, and V. Z. Pletnev

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117871 Russia*

Key words: pea lectin, crystalline complex, X-ray diffraction analysis.

* To whom correspondence should be addressed.