



УДК 577.322(53+6):539.26

УГЛЕВОДНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЛЕКТИНА ГОРОХА ПО ДАННЫМ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА

© 1999 г. С. Н. Ружейников[#], И. Ю. Михайлова,
И. Н. Цыганник, В. Дюэкс*, В. Пэнгборн*, В. З. Плетнев

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

* Медицинский исследовательский центр им. Хауптмана – Вудвард, Буффало (Нью-Йорк), США

Поступила в редакцию 20.01.99 г. Принята к печати 11.02.99 г.

Методом молекулярного замещения установлена пространственная структура двух новых кристаллических комплексов лектина гороха (*Pisum sativum*, димер, $M \sim 50$ кДа) с *D*-глюкопиранозой ($P2_12_12_1$, a 73.4, b 107.7, c 64.6 Å) и *D*-маннопиранозой ($P2_12_12_1$, a 62.6, b 135.1, c 54.9 Å) при разрешении 2.3 и 1.98 Å, соответственно. Структуры уточнены до значений *R*-фактора 0.155 и 0.217. Сравнительный анализ найденных и определенных нами ранее структур показал, что связывание лектином α - и β -форм моносахаридов происходит в отношении, близком к их соотношению в растворе. Исследованы структурные особенности углеводной специфичности лектина гороха. На основе энергетических расчетных методов разработана статистико-динамическая модель углеводного связывания, позволяющая оценить область взаимодействия моносахарида с углеводсвязывающим центром белка и спектр ориентаций сахара, обеспечивающих его продуктивное связывание. Предложены аминокислотные замены в лектине Asn39 \rightarrow Gln и Asn39 \rightarrow Lys, способные вызвать направленные изменения в специфике связывания им родственных углеводов.

Ключевые слова: лектин гороха; кристаллический комплекс; рентгеноструктурный анализ; углеводная специфичность; белковая инженерия; молекулярная механика.

ВВЕДЕНИЕ

Лектины – это белки неиммунной природы, способные специфично и обратимо связываться с углеводами или углеводными фрагментами гликоконъюгатов без нарушения ковалентной структуры узнаваемых гликозильных лигандов [1].

Объект наших исследований – глюкозо- и маннозоспецифичный лектин гороха (*Pisum sativum*) – относится к семейству растительных лектинов, функционирующих в виде гомодимера. Мономер состоит из двух полипептидных цепей, тяжелой β (остатки 1–181) и легкой α (остатки 188–239) с мол. массой 19.9 и 5.2 кДа, образовавшихся путем вырезания из пролектина фрагмента 182–187 в результате его посттрансляционной модификации [2].

Пространственная структура лектина гороха определена как для свободной формы [2–4], так и для ряда его комплексов: с триманнозой [5], бензил-2-ацетамидо-2,3-дидезокси-3-иод-*D*-глюкопиранозидом [6], *D*-глюкопиранозой [7] и *D*-маннопиранозой [8]. Несмотря на большое количество структурных работ по углеводным комплексам лектинов, данных по исследованию тонких особенностей углеводной специфичности этих белков недостаточно.

В настоящей работе методами белковой кристаллографии изучены два кристаллических комплекса лектина гороха (*Pisum sativum*, димер, $M \sim 50$ кДа) – с *D*-глюкопиранозой (разрешение 2.3 Å) и *D*-маннопиранозой (1.8 Å) с новыми параметрами кристаллической ячейки ($P2_12_12_1$, a 73.4, b 107.7, c 64.6 Å и $P2_12_12_1$, a 62.6, b 135.1, c 54.9 Å соответственно). Методами молекулярного моделирования исследован процесс связывания этих моносахаридов с лектином.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ уточненных (табл. 1) структур новых кристаллических форм комплексов лектина гороха с *D*-глюкопиранозой и *D*-маннопиранозой показал, что их пространственная организация достаточно консервативна и близка к найденной нами ранее в других кристаллических формах [7, 8]. Различия в положениях атомов основных цепей белка практически не выходят за пределы ошибки эксперимента (табл. 2). Заметная разница в ориентации боковых цепей, по-видимому, обусловлена особенностями кристаллической упаковки. В каждой димерной структуре локализовано более 200 молекул упорядоченной воды, что составляет примерно одну молекулу воды на два аминокислотных остатка.

[#] Автор для переписки (тел.: 330-75-10; e-mail: snr@amber.siobc.ras.ru).

Таблица 1. Статистика уточнения углеводсодержащих комплексов лектина

Параметры	Кристаллический комплекс	
	Лектин (pI 7.6) + D-глюкоза	Лектин (pI 6.9) + D-манноза
Число неводородных атомов	белковая глобула – 3574, ионы – 4, углевод – 24, всего – 3602	
Число молекул воды	256	232
$R_{\text{фактор}} (F_0 > 2\sigma(F_0)), \%$	15.5	20.6
R_{free} (по 10% данных), %	18.9	27.6
Средний B -фактор, \AA^2	вся структура	27.0
	основная цепь	23.7
	боковые цепи	28.0
	углеводы	22.9
Заполнение углеводсвязывающего центра, %	95	97
Позиционная ошибка по Лузатти, \AA [23]	0.24	0.27
Позиционная ошибка σ_A , \AA [24]	0.31	0.35
RMSD* параметров от идеальных значений	связь, \AA	0.009
	угол, град	1.88
	торсионный угол, град	26.56
	планарность, град	1.32
Статистика по углам $\phi, \psi^{**}, \%$	разрешенные	85.9
	дополнительно разрешенные	13.5
	запрещенные	0.6
		85.0
	15.0	
	0.0	

* Среднеквадратичное отклонение.

** Статистика приведена по областям карты Рамачандрана для всех остатков, кроме Gly и Pro.

Довольно редко встречающуюся в белковых структурах конфигурацию β -изгиба типа V [9] принимает участок Thr27-Lys28-Glu29-Lys30 ($\phi_{28} \approx -75^\circ, \psi_{28} \approx 125^\circ, \phi_{29} \approx 80^\circ, \psi_{29} \approx -45^\circ$; углы ус-

реднены по четырем мономерам) в структурах комплексов лектина (pI 7.6) в данной работе в комплексе с глюкозой и в работе [8]. Формально это приводит к тому, что остаток Glu29, составля-

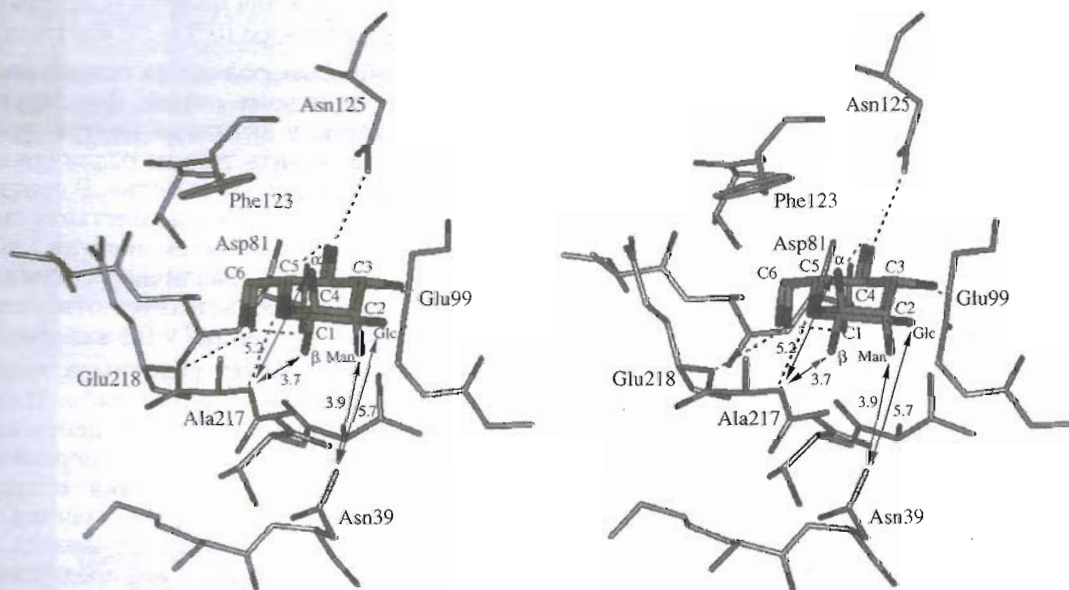


Рис. 1. Стереонизображение углеводсвязывающего центра лектина с суперпозицией молекул связанных сахаров. Пунктирными линиями показаны водородные связи. Также приведены дополнительные стабилизирующие взаимодействия, частично отвечающие за тонкое углеводное распознавание. Стрелками с обозначением расстояний в \AA показаны основные электростатические взаимодействия, определяющие различия в связывании двух различных конформаций глюкозы и маннозы.

Таблица 2. Среднеквадратичные отклонения (RMSD, Å) координат атомов комплексов лектина с углеводами

RMSD, Å	Структурная единица	Лектин (pI 7.6) + D-Glu*	Лектин (pI 6.9) + D-Man**
В кристаллическом комплексе	α - и β -полипептидные цепи	0.24 (0.23)	0.39 (0.22)
	углевод	0.30 (0.13)	0.22 (0.18)
От усредненной структуры	димер	0.66 (0.55)	0.59 (0.63)
	основная цепь углевод	0.18 (0.17)	0.23 (0.18)
		0.16 (0.18)	0.18 (0.16)

* В скобках приведены соответствующие данные из работы [7] для комплекса лектина (pI 6.9) с D-глюкозой.

** В скобках приведены соответствующие данные из работы [8] для комплекса лектина (pI 7.6) с D-маннозой.

Таблица 3. Усредненная по четырем комплексам геометрия координационных сфер ионов Ca^{2+} и Mn^{2+} в металлсвязывающих центрах лектина

Аминокислотный остаток*	Расстояние, Å**	
	Ca^{2+}	Mn^{2+}
Glu119 (O ^{δ1})	–	2.34 (0.11)
Asp121 (O ^{δ1})	2.56 (0.12)	2.17 (0.09)
Asp121 (O ^{δ2})	2.44 (0.02)	–
Phe123 (CO)	2.22 (0.03)	–
Asn125 (O ^{δ1})	2.24 (0.04)	–
Asp129 (O ^{δ2})	2.46 (0.11)	–
Asp129 (O ^{δ1})	–	2.33 (0.13)
His136 (N ^{ε2})	–	2.39 (0.06)
H ₂ O (O)	2.55 (0.47)	–
H ₂ O (O)	2.19 (0.14)	–
H ₂ O (O)	–	2.30 (0.33)
H ₂ O (O)	–	1.95 (0.07)

* В скобках указаны атомы, вовлеченные в образование водородной связи.

** В скобках дано среднеквадратичное отклонение от усредненного состояния по работам [7, 8] и настоящей].

Таблица 4. Система водородных связей в углеводсвязывающих центрах комплексов лектина с углеводами

Аминокислотный остаток*	Атом углевода	Длина водородной связи, Å		
		Лектин (pI 7.6) + D-Glc**	Лектин (pI 6.9) + D-Man***	Среднее
Gly99 (NH)	O3	2.75 (2.92)	2.92 (2.76)	0.0
Asn125 (N ^{δ2} H)	O4	2.81 (2.91)	2.87 (2.78)	0.0
Ala217 (NH)	O5	2.97 (3.04)	2.98 (3.15)	0.06
Glu218 (NH)	O6	3.25 (3.04)	3.20 (3.18)	0.06
Asp81 (O ^{δ1})	(H)O4	2.64 (2.61)	2.64 (2.76)	0.27
Asp81 (O ^{δ2})	(H)O6	2.81 (2.82)	2.82 (2.74)	0.48

* В скобках указаны атомы и группы атомов, непосредственно участвующие в образовании водородных связей.

** В скобках приведены соответствующие данные из работы [7] для комплекса лектина (pI 6.9) с D-глюкозой.

*** В скобках приведены соответствующие данные из работы [8] для комплекса лектина (pI 7.6) с D-маннозой.

ющий 0.6% от общего числа остатков, попадает в H-область конформационной карты Рамачандра [10], которая является запрещенной (табл. 1).

Как видно из табл. 2–4, положение природных ионов Ca^{2+} и Mn^{2+} , а также углеводов в соответствующих связывающих центрах четырех комплексов лектина ([7], [8] и настоящая работа) близко с точностью до экспериментальной ошибки. В найденных структурах молекулы глюкозы и маннозы в классической конформации кресла располагаются в небольшой полости на поверхности белка вблизи металлсвязывающего центра и удерживаются там шестью водородными связями с функциональными группами белка (рис. 1, табл. 4). Как и в случае ConA [11], редкое для белков конформационное состояние с *цис*-пептидной связью, предшествующей остатку Asp81 в лектине, обеспечивает ориентацию соответствующей боковой цепи, необходимую для образования двух стабилизирующих водородных связей с углеводом.

Основной вклад в образование водородных связей со стороны моносахаридов вносят гидроксильные группы при углеродных атомах C3, C4 и C6, а также циклический атом кислорода O5. При этом OH-группы при C4 и C6 являются как донорами, так и акцепторами протонов. Гидроксильные группы при C1 и C2 не оказывают сильного влияния на связывание углеводов, что подтверждается небольшим различием в связывании глюкозы и маннозы ($K_d = 3.6$ и 1.6 мМ, соответственно, [12]), отличающихся конфигурацией атома C2, а также тем, что связывание α - и β -форм углевода происходит в соотношении ($\alpha/\beta = 0.55$ для глюкозы и 1.8 для маннозы), близком к их содержанию в растворе (0.5 и 2.0 соответственно).

Таким образом, только на основе статической картины водородных связей, фиксирующей молекулу сахаров в активном центре лектина, невозможно объяснить тонкие различия в углеводной специфичности этого белка. В соответствии с уравнением, выражающим константу связывания через изменение свободной энергии Гиббса $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K$, различие в связывании глюкозы и маннозы соответствует относительно небольшому изменению $\Delta G = 0.5$ ккал/моль.

Статический расчет разницы в энергиях связывания глюкозы и маннозы (табл. 5) приводит к значению 3–4 ккал/моль, что существенно превышает различие в свободных энергиях реакций комплексообразования лектина с маннозой и глюкозой. Предполагая, что различие в изменении энтропии в процессе связывания лектином глюкозы и маннозы мало, мы приходим к заключению, что статический метод расчета энергии связывания не обеспечивает точности, необходимой для объяснения тонкой углеводной специфичности лектина. В связи с этим, для изучения белок-углеводного взаимодействия на основе метода молекулярной механики была разработана

Таблица 5. Энергия (ккал/моль) взаимодействия углевода с углеводсвязывающим центром лектина гороха, а также среднеквадратичное отклонение (RMSD, Å) положения связанного углевода при заданных аминокислотных заменах

Замена в полипептидной цепи	Форма моносахарида	Комплекс лектина с глюкозой				Комплекс лектина с маннозой			
		E_{total}	E_{vdw}	E_{elec}	RMSD	E_{total}	E_{vdw}	E_{elec}	RMSD
—	α	-27.5	-22.8	-4.7	0	-30.8	-23.8	-7.0	0
	β	-27.8	-22.9	-4.9	0	-31.5	-24.2	-7.4	0
Asn39 → Gly	α	-27.0	-22.4	-4.6	0.04	-30.2	-23.5	-6.7	0.03
	β	-27.3	-22.5	-4.8	0.05	-30.8	-23.6	-7.1	0.04
Asn39 → Ala	α	-27.1	-22.4	-4.7	0.05	-30.2	-23.5	-6.7	0.03
	β	-27.3	-22.5	-4.8	0.04	-31.0	-23.8	-7.2	0.05
Asn39 → Gln	α	-27.8	-23.6	-4.2	0.45	-31.8	-24.7	-7.1	0.06
	β	-27.8	-24.0	-3.8	0.08	-32.8	-26.5	-7.3	0.40
Asn39 → Lys	α	-29.1	-24.3	-4.8	0.37	-31.7	-25.0	-6.7	0.1
	β	-29.6	-24.9	-4.7	0.06	-31.8	-25.2	-6.6	0.25

E_{total} , E_{vdw} и E_{elec} – соответственно общая, ван-дер-ваальсовская и электростатическая энергии.

статистико-динамическая модель связывания углевода.

Полученные результаты показали, что связывание глюкозы и маннозы происходит из близких по форме (рис. 2) и объему областей пространства (рис. 3), называемых в дальнейшем “областью притяжения”. На рис. 4 представлена зависимость процентного содержания продуктивных для связывания стартовых ориентаций углевода от его удаленности от места посадки в связывающем центре лектина. Манноза по сравнению с глюкозой в целом обладает более широким спектром благоприятных для связывания ориентаций. При попадании углевода в результате диффузии в “область притяжения” белка молекула маннозы будет чаще, чем глюкоза, затягиваться в углеводсвязывающий центр лектина, что должно отвечать более высокой величине соответствующей константы скорости прямой реакции.

Обращает на себя внимание тот факт, что при приближении углевода к связывающему центру наблюдается некоторое возрастание продуктивных для связывания ориентаций, особенно для маннозы. Результаты анализа траекторий движения моноуглевода показали, что вблизи связывающего центра на молекулу субстрата в произвольной ориентации действует момент сил. При этом результирующая сила, приложенная не к центру масс углевода, стремится его повернуть. После поворота с возможным частичным выталкиванием молекула углевода может принять благоприятную ориентацию с последующей посадкой в связывающий центр белка. На дальних же расстояниях при непродуктивной стартовой ориентации углевода момент сил стремится к нулю, а сила, приложенная к его центру масс, не направлена к месту посадки и связывания не происходит.



Рис. 2. Стереобразное изображение “области притяжения” лектина с центрами масс углевода (темное облако). Глюкоза в углеводсвязывающем центре изображена жирной линией.

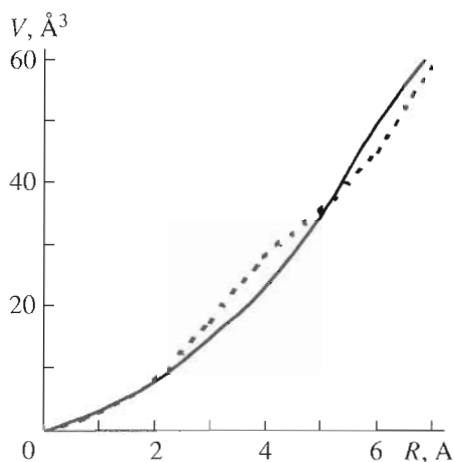


Рис. 3. Зависимость объема (V) зоны притяжения от радиуса (R) исследуемого пространства для глюкозы (сплошная линия) и маннозы (пунктирная линия).

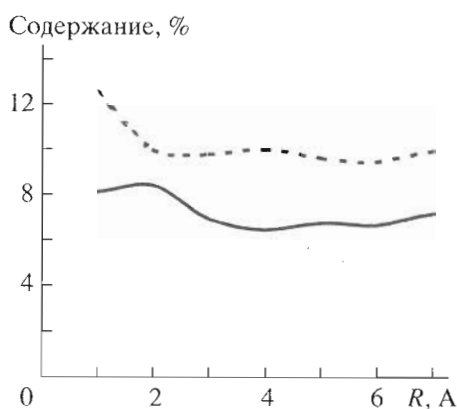


Рис. 4. Зависимость процентного содержания продуктивных для связывания ориентаций глюкозы (сплошная линия) и маннозы (штриховая линия) от удаленности углевода (R) от места посадки.

С целью выявления различий в связывании глюкозы и маннозы был проведен детальный анализ энергетики взаимодействия лектина гороха с углеводом. Полученные расчетные результаты показали, что различие в связывании α - и β -форм углевода одного вида заметно меньше, чем различие в связывании углеводов разных видов. Кроме того, в случае маннозы наблюдаемое в растворе равновесие α - и β -форм ($\alpha/\beta = 2.0$) проявляет тенденцию к смещению в сторону β -формы при связывании углевода лектином ($\alpha/\beta = 1.8$).

Так как молекулы глюкозы и маннозы различаются конфигурацией второго углеродного атома, то именно взаимодействие гидроксильной группы при этом атоме со связывающим центром лектина фактически определяет тонкие особенности углеводной избирательности. Причем для маннозы это взаимодействие более сильное, чем для глюкозы. Наиболее сильно гидроксил при

атоме C2 углевода взаимодействует с боковой цепью остатка Asn39 (рис. 1). При этом для маннозы взаимодействие H(C2)ОН-группы с боковой цепью остатка Asn39 составляет 20% всех взаимодействий группы H(C2)ОН, тогда как для глюкозы этот вклад не превышает 5%. В рассматриваемых четырех углеводных комплексах, а также в свободной форме лектина, конформационное состояние остатка Asn39 отвечает L -области конформационной карты Рамачандрана ($\phi \approx 45^\circ$ и $\psi \approx 60^\circ$) с энергетически предпочтительным значением угла χ_1 боковой цепи $\approx -60^\circ$ [10]. В данной ориентации боковая цепь аспарагина направлена в сторону активного центра лектина и может принимать участие в углеводном связывании.

С целью направленного изменения особенностей углеводной специфичности лектина был промоделирован ряд возможных точечных мутаций с заменой остатка Asn39 на Gly, Ala, Gln и Lys (табл. 5). Полученные результаты позволили сформулировать ряд выводов. При замене Asn39 на остаток Ala или Gly ожидается уменьшение эффективности связывания как маннозы, так и глюкозы. Замена же Asn39 \rightarrow Gln должна привести к появлению позиционного различия в посадке α - и β -форм углеводов (~ 0.4 Å) и к усилению связывания маннозы на ~ 1 ккал/моль. На связывание глюкозы данная замена практически не влияет. Для маннозы энергетическая предпочтительность взаимодействия β -формы (по отношению к α -форме) с углеводсвязывающим центром лектина объясняет экспериментально наблюдаемое смещение равновесия при связывании (по сравнению с раствором) в сторону этой формы (табл. 1). При замене Asn39 \rightarrow Lys относительное усиление связывания глюкозы по сравнению с маннозой (соответственно на 2 и 0.5 ккал/моль) должно привести к относительному повышению сродства лектина гороха к глюкозе. При этом приближение положительно заряженной группы к месту посадки углевода (в случаях Lys и Gln) должно увеличить общую скорость их связывания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение и очистка лектина семян гороха (*P. sativum*) проводилась по методике [7]. Для кристаллизации использовали белковые фракции с pI 6.9 и 7.6.

Измерение интенсивностей дифракционных отражений кристаллов комплекса лектина с маннозой и глюкозой проводилось при комнатной температуре на одноканальном четырехкружном автоматическом дифрактометре P3 (Syntex, США) и на автодифрактометре Rigaku R-axis II (Япония) с двумерным детектором (табл. 6).

Структура кристаллических форм лектина была определена методом молекулярного замещения по программе XPLOR [13] с использованием в качестве модели комплекса лектина с глюко-

зой (Brookhaven Protein Data Bank, код 2bqp) [7]. Кристаллографическое уточнение проведено по программе XPLOR с применением интерактивной графической программы CHAIN [14] на графической станции Silicon Graphics Indigo (США). На начальной стадии уточнение осуществлялось с использованием некристаллографической симметрии димерной структуры лектина [7]. Далее оба мономера уточнялись независимо.

Вследствие неупорядоченности С-концевых фрагментов 235–239 в структуре обоих мономеров определить с необходимой степенью достоверности их положение на карте электронной плотности не удалось. На завершающих этапах уточнения структуры молекула углевода рассматривалась как суперпозиция α - и β -форм с оптимизацией соответствующих коэффициентов заполнения активного центра. Окончательные результаты уточнения и оценки качества геометрии и стереохимии структур, полученные с помощью программ PROCHECK [15] и XPLOR [13], отражены в табл. 1. Стилизованное изображение углеводсвязывающего центра лектина на рис. 1 получено с помощью программы SETOR [16].

В выбранной схеме расчета при изучении блок-углеводного взаимодействия смещение атомов белка от экспериментальных положений в области углеводсвязывающего центра были ограничены с помощью мягких штрафных функций. Параметры атом-атомных взаимодействий представлены силовым полем CHARMM [17], реализованным в программном комплексе XPLOR. Для подбора диэлектрической проницаемости среды была проведена минимизация потенциальной энергии системы с использованием различных значений ϵ . Наилучшее совпадение с экспериментальными данными по связанным углеводам (RMSD 0.3 Å) наблюдалось при $\epsilon = 4.0$. Многочисленные литературные данные (см. [18–21]) указывают на отсутствие рационального подхода к учету влияния растворителя на моделируемые процессы межмолекулярного взаимодействия. Поэтому в наших расчетах учитывалось влияние только четырех молекул воды, находящихся в металлсвязывающем центре.

Стартовое положение молекулы углевода вблизи активного центра белка генерировалось таким образом, чтобы, во-первых, избежать существенного наталкивания на белковую цепь (в качестве пороговой величины выбрано 50 ккал/моль) и, во-вторых, чтобы расстояние между центрами масс экспериментального и случайного положений углевода не превышало 7 Å. Первое требование связано с тем, что при диффузии молекула углевода не сможет приблизиться к белковой глобуле на расстоянии с выбранным пороговым значением энергии. Второе требование обусловлено тем, что на расстоянии 7 Å энергия взаимодействия с углеводсвязывающим центром становится соизмеримой с $3RT \approx 1.8$ ккал/моль, т.е. с

Таблица 6. Кристаллографические и экспериментальные данные.

Параметры элементарной ячейки		Кристаллический комплекс	
		Лектин (p/7.6) + глюкоза	Лектин (p/6.9) + манноза
$P2_12_1$	$a, \text{Å}$	73.371	62.553
$Z 4$	$b, \text{Å}$	107.727	135.123
	$c, \text{Å}$	64.564	54.904
Параметр Мэтьюза, $\text{Å}^3/\text{Да}$		2.45	2.23
Разрешение, Å		2.3	1.98
Общее количество рефлексов		21 036	32 838
Количество рефлексов $F > 2\sigma(F)$		20 383	31 755
Полнота набора, %		95.7	96.3

кинетической энергией теплового движения молекулы углевода. Процесс связывания моделировался минимизацией энергии системы, состоящей из углевода в поле, рассчитанном по экспериментально установленным координатам атомов белка. Процесс связывания оценивался по среднеквадратичному отклонению между координатами неводородных атомов экспериментально найденного и теоретически рассчитанного положений углевода. Связывание считалось успешным, если среднеквадратичное отклонение не превышало величины экспериментальной погрешности, составляющей ~ 0.3 Å (табл. 1).

Область взаимодействия была представлена набором дискретных узлов с шагом 0.5 Å в радиусе 7 Å в зоне свободного пространства вокруг углеводсвязывающего центра с последующей оценкой каждого узла на продуктивность связывания при оптимальной ориентации сахара. Это позволило выделить эллипсоидообразную область притяжения (объем 60 Å^3 , ~ 500 узлов), из которой при определенных ориентациях углевода происходит его связывание. В соответствии с принятыми допущениями в данной области с дополнительным внешним слоем толщиной в 1 Å был сгенерирован статистически достоверный набор стартовых положений углевода, равномерно покрывающий с шагом 10° трехмерное угловое пространство возможных ориентаций. Всего для каждого углевода в области притяжения случайным образом по шести степеням свободы было сгенерировано 25 000 стартовых положений.

Аминокислотные замены остатка Asn39 осуществлялись с помощью программы SWISS-PDB-VIEWER [22]. Наиболее вероятная структура оптимизировалась методом низкотемпературной молекулярной динамики (50 К в течение 50 пс) и последующей молекулярной механики. Дальней-

шее моделирование связывания сахара в α - и β -формах проводилось методом молекулярной механики при оптимальных состояниях боковых цепей Gln39 и Lys39 (табл. 5).

Работа выполнена при частичной поддержке гранта 03.0002Н-322 (ГНТПР "Новейшие методы биоинженерии", направление "Белковая инженерия") "Структурные основы углеводной специфичности лектинов и принципы направленного изменения их биологической активности".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kocourek J., Horejsi V. // *Lectins: Biology, Biochemistry, and Clinical Biochemistry*. V. 3 / Ed. T.C. Bog-Hansen. Berlin, New York, 1983. P. 3–6.
2. Einspahr H., Parks E.H., Suguna K., Subramanian E., Suddath F.L. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. P. 16518–16527.
3. Riskulov R.R., Dobrokhotova Z.D., Kuzev S.V., Lob-sanov 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. P. 97–101.
4. Einspahr Y., Suguna R., Suddath F.L., Ellis G., Helliwell J.R., Papiz M.Z. // *Acta Crystallogr.* 1985. V. B41. P. 336.
5. Rini J.M., Hardman K.M., Einspahr H., Suddath F.L., Carver J.P. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 10126–10132.
6. Лобсанов Ю.Д., Плетнев В.З. // *Биоорган. химия*. 1995. Т. 21. С. 479–480.
7. Плетнев В.З., Ружейников С.Н., Цыганник И.Н., Михайлова И.Ю., Дюэкс В., Гош Д., Пэнгборн В. // *Биоорган. химия*. 1997. Т. 23. С. 469–478.
8. Ружейников С.Н., Михайлова И.Ю., Цыганник И.Н., Пэнгборн В., Дюэкс В., Плетнев В.З. // *Биоорган. химия*. 1998. Т. 24. С. 313–315.
9. Chou P.Y., Fasman G.D. // *J. Mol. Biol.* 1977. V. 115. P. 1146–1152.
10. Попов Е.М. Структурная организация белка. М.: Наука, 1997. Т. 3.
11. Naismith J.H., Habash J., Harrop S., Helliwell J.R., Hunter W.N., Wan T.C.M., Weisgerber S., Kalb (Gilboa) A.J., Yariv J. // *Acta Cryst.* 1993. V. D49. P. 561–571.
12. Shimura K., Kasai K. // *J. Biochem.* 1996. V. 120. P. 1146–1152.
13. Brunger A.T. X-PLOR (Version 3.1) Manual. New Haven; London: Yale University, 1992.
14. Jones T.A. // *J. Appl. Crystallogr.* 1978. V. 11. P. 268–272.
15. Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M. // *J. Appl. Crystallogr.* 1993. V. 26. P. 283–291.
16. Evans S.V. // *J. Mol. Graphics.* 1993. V. 11. P. 134–138.
17. Brooks B., Brucoleri R., Olafson B., States D., Swaminathan S., Karplus M. // *J. Comp. Chem.* 1983. V. 4. P. 187–217.
18. Toone E.J. // *Curr. Opin. Struc. Biol.* 1994. V. 4. P. 719–728.
19. Beierbeck H., Delbaere L.T.J., Vandonselaar M., Lemieux R.U. // *Can. J. Chem.* 1994. V. 72. P. 463–470.
20. Isbister B.D., Hilaire P.M.St., Toone E.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 12877–12878.
21. Helms V., Wade R.C. // *Biophys. J.* 1995. V. 69. P. 810–824.
22. Guex N., Peitsch M.C. // *Electrophoresis*. 1997. V. 18. P. 2714–2723.
23. Luzatti P.V. // *Acta Cryst.* 1952. V. 5. P. 802–810.
24. Read R.J. // *Acta Cryst.* 1986. V. A42. P. 140–149.

Carbohydrate Specificity of Pea Lectin Revealed by X-ray Analysis

S. N. Ruzhenikov*#, I. Yu. Mikhailova*, I. N. Tsygannik*,
W. Duax**, W. Pangborn**, and V. Z. Pletnev*

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

**Hauptman-Woodward Medical Research Center, Buffalo, NY, 14203 United States

Structures of two new crystal complexes of pea lectin (*Pisum sativum*, dimer, molecular mass ca. 50 kDa) with *D*-glucopyranose ($P2_12_12_1$ space group; unit cell parameters: a 73.4, b 107.7, and c 64.6 Å) and *D*-mannopyranose ($P2_12_12_1$; a 62.6, b 135.1, and c 54.9 Å) were solved by the molecular replacement approach at 2.3 and 1.98 Å resolutions and refined to the R factor values of 0.155 and 0.217, respectively. The comparative analysis of the structures found and those determined earlier showed pea lectin to bind the α - and β -forms of monosaccharides in a ratio close to that in solution. Stereochemical features of the carbohydrate specificity of pea lectin were studied, and a statistical-dynamic model of the carbohydrate binding was developed using energy computation methods. This model enables the evaluation of the region of the monosaccharide interaction with the protein carbohydrate-binding site and the ensemble of the carbohydrate orientations providing for its productive binding. Amino acid substitutions, Asn39 \rightarrow Gln and Asn39 \rightarrow Lys, capable to cause directed changes in the lectin binding specificity toward the cognate carbohydrates were proposed.

Key words: pea lectin, crystal complex, X-ray analysis, carbohydrate specificity, protein engineering, molecular mechanics

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 3307510; e-mail: snr@amber.siobc.ras.ru.