

CARBOHYDRATE-RECOGNIZING PROTEINS (LECTINS)

V. V. IGNATOV

Carbohydrate-recognizing proteins (lectins) are molecular structures little-known to a large section of biologists. The history of the discovery of lectins, their role in the organism, and the use of lectins preparation in experimental biology and medicine are outlined.

Статья об углеводузнающих белках – лектинах знакомит читателя с этими малоизвестными для широкого круга биологов молекулярными структурами, историей открытия лектинов, их ролью в организме и с использованием препаратов лектинов в экспериментальной биологии и медицине.

УГЛЕВОДУЗНАЮЩИЕ БЕЛКИ – ЛЕКТИНЫ

В. В. ИГНАТОВ

Саратовский государственный университет

ВВЕДЕНИЕ

При рассмотрении различных уровней организации живой материи обращает на себя внимание важнейшее значение явления комплементарности. Под ним биологи понимают пространственное соответствие межклеточных, субклеточных и молекулярных взаимодействий отдельных элементов клетки (клеток), позволяющее популяции клеток (клетке) и ее субклеточным структурам оптимальным образом организовывать процессы жизнедеятельности и выживать в изменчивом мире окружающей среды. Понятие комплементарности встречается во всей гамме актов молекулярной биологии, когда мы говорим о комплементарности нуклеотидных последовательностей в двуничейной структуре нуклеиновых кислот, во взаимодействии их с белками и в энзимологии в ходе фермент-субстратных взаимоотношений, в иммунологии в ходе взаимоотношений антиген–антитело и т.д.

Лектин-углеводные взаимоотношения на фоне перечисленного малоизвестны неспециалистам при всей грандиозности того значения, которое они имеют в биологии. Именно поэтому хотелось бы вкратце рассказать о лектинах, их свойствах, месте этих белков в жизнедеятельности организмов и их использовании в экспериментальной биологии и медицине. По формулировке доктора Яна Коцурека¹, с которой согласны многие лектинологи, лектины – это белки, не относящиеся к классу иммунных (иммунные белки – иммуноглобулины – антитела), способные к обратимому связыванию с углеводной частью гликоконъюгатов² без нарушения ковалентной структуры любых из узнаваемых гликозильных лигандов (от лат. ligo – связываю; в химии молекулы или ионы, принимающие участие в связывании).

При знакомстве читателя с лектинами мы предполагаем, что все знают, что: а) белки составляют основу всего живого, б) состоят из аминокислот, связанных между собой пептидной связью в цепи различной длины и соответственно молекулярной массы, в) в состав белков входят 22 “белковые”

¹ Ян Коцурек – один из лидеров современной лектинологии. Родился в Чехословакии в 1926 году, профессор, доктор наук, в 1971–1986 годах зав. кафедрой биохимии Карлового университета в Праге, в настоящее время руководитель лаборатории производства и контроля препаратов лектинов в том же университете.

² Гликоконъюгаты – комплексы полисахаридов с иными полисахаридами или белками.

аминокислоты, г) белки имеют так называемую первичную структуру, определяемую последовательностью аминокислот в цепи, вторичную структуру, характеризующуюся пространственной ориентацией аминокислот в полипептидной цепи (α - и β -цепи), третичную структуру, то есть пространственное расположение всей полипептидной цепи, характеризующей белок, и, наконец, четвертичную структуру, если белок состоит из двух и более субъединиц.

Для полноты представлений о белке следует вспомнить, что белки бывают простыми, если в их состав входят только аминокислоты, и сложными, если кроме аминокислот они связаны ковалентно или нековалентно с небелковыми структурами: углеводами, липидами и т.д. Такие сложные белки или протеиды в зависимости от структуры небелковой части называются соответственно гликопротеидами, липопротеидами и т.д. На рис. 1 видны все уровни структур гемоглобина человека и животных. Гемоглобин — это типичный хромопротеид, то есть сложный белок, состоящий из пигмента — гема и белковой части. Четвертичная структура гемоглобина представлена четырьмя субъединицами, пространственно удерживаемыми силами нековалентного взаимодействия.

В последние два десятка лет достигнуты значительные успехи в технической разработке метода анализа структуры белков. Это позволило сосредоточить внимание исследователей на топологии самой белковой молекулы. Они обнаружили при этом новое важное свойство белковых молекул: способность образовывать внутри больших молекул меньшие белковые структуры — домены. Это как бы отдельные части большой молекулы, выполняющие важную биологическую роль. Домены принимают участие в образовании комплекса между ферментом и субстратом в акте ферментного катализа, во взаимоотношении антигена и антитела, в иммунологических реакциях, в “узнавании” регуляторного белка рецепторными зонами клетки и т.д. Это важно при рассмотрении лектинов и их роли в регуляции жизненных процессов.

На рис. 2 мы видим топологию одного из белков вируса гриппа — гемагглютинина, имеющего большое значение в процессах поражения тканей человека и животных при вирусной инфекции (α -спирали белка обозначены цилиндрами, β -цепи указаны стрелками). Именно эти домены принимают участие в присоединении к рецепторным участкам эритроцитов и в их склеивании (агломинации). Рецепторными участками клеток являются, как правило, определенные моно- и олигосахара (oligos — немногочисленные; небольшая цепочка, состоящая из моносахаров).

Еще на заре современного учения о ферментах была широко распространена идея соответствия субстрата (вещества, на которое действует фермент) со структурой фермента по принципу соответствия

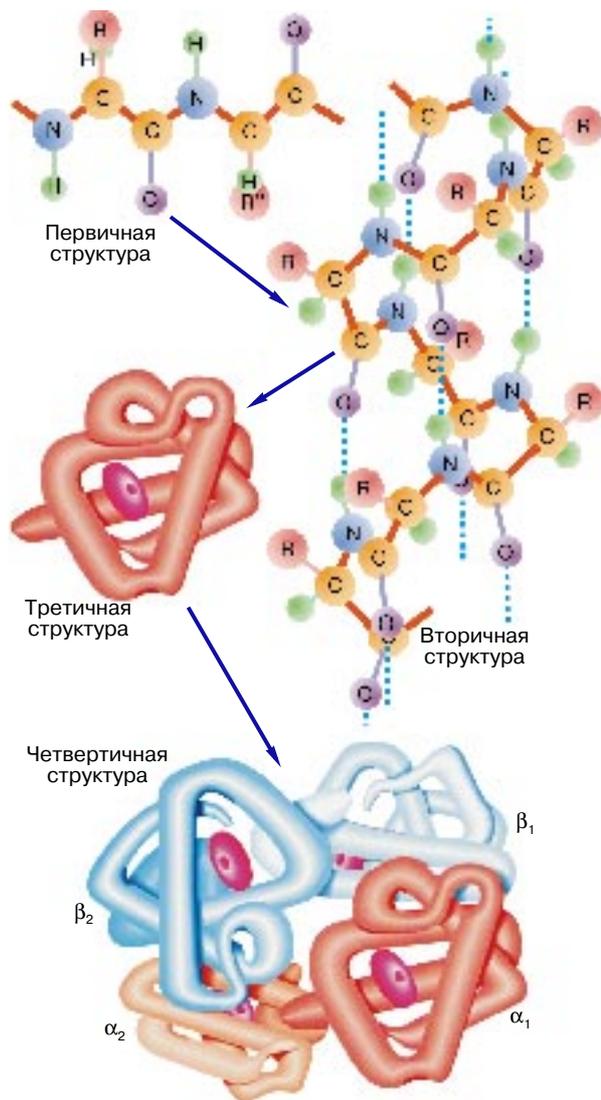


Рис. 1. Схема первичной, вторичной, третичной и четвертичной структуры молекулы гемоглобина

“ключа к замку”. Высочайшая специфичность углеводов рецепторной зоны клеток или молекулярной структуры к ферменту или лектину, то есть комплементарность, лежит в основе многих важных биологических эффектов: эффективность каталитического действия, токсический эффект и т.д. Лектины и ферменты, вернее, их доменные центры выступают в качестве чувствительнейших биосенсоров, детектирующих определенные углеводные последовательности в олигосахаридах, которые являются специфическими лигандами в углевод-белковом взаимодействии.

Таким образом, лектины, с одной стороны, входя в структуру тканей животных, растений, микроорганизмов, принимают участие как в регулировании их

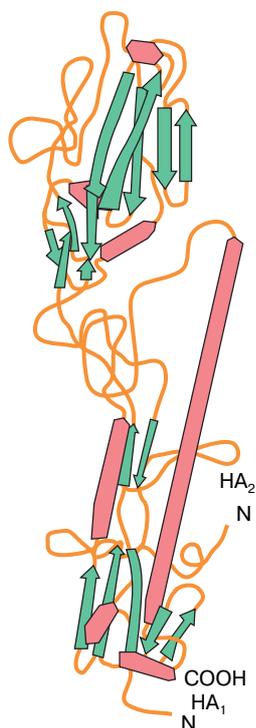


Рис. 2. Пространственная модель гемагглютинаина вируса гриппа

метаболизма, так и в защите от некоторых агентов внешней среды. С другой стороны, лектины, будучи выделены из живых объектов, могут стать ценными биохимическими реагентами, использование которых получает свое развитие в экспериментальной цитохимии, диагностике некоторых заболеваний и, наконец, в биотехнологических процессах выделения некоторых сложных углеводсодержащих веществ. В последние годы делаются попытки использования лектинов и в качестве лекарственных препаратов.

Все сказанное о лектинах привлекает к их изучению исследователей, работающих в разных областях биологической науки, и прежде всего в биохимии, цитологии, микробиологии, физиологии растений, биотехнологии и фармации. Несмотря на то что первый лектин был выделен более сотни лет тому назад, интенсивно лектины стали изучать всего лишь последние тридцать лет. Один раз в четыре года лектинологи всего мира собираются на конференции. Последняя конференция — “Interlec-14” проходила в мае 1992 года в Калькутте (Индия). У лектинологии — науки, развивающейся на стыке различных биологических дисциплин, большое будущее.

НЕСКОЛЬКО СЛОВ ОБ ОТКРЫТИИ ЛЕКТИНА

Первый лектин был открыт доктором Германом Петером Штильмарком (1860–1923) в Дерптском

университете. Дерптский университет занимал почетное место в иерархии университетов Российской империи конца прошлого века. В нем работали и учились многие видные деятели науки и культуры России, Эстонии и Германии. В то время работа мало кому известного медика, представленная к защите на соискание ученой степени доктора медицины, прошла незаметно. Молодой соискатель в 1888 году представил к защите диссертацию “Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus comm. L.* und einigen anderen *Euphorbiaceen*”, выполненную в Институте фармакологии университета, посвященную вопросу использования природы токсичности семян клещевина. Клещевина известна как растение семейства молочайных, как правило, однолетнее (на юге двух- и трехлетнее), из семян которого добывают касторовое масло. В лечебном деле это масло является сильным слабительным, а в технике использовалось в двигателях в качестве смазывающего масла, слабо загустевающего при низких температурах. Семена клещевина и неочищенное масло очень токсичны для человека, что и привлекло внимание фармакологов Дерптского университета.

Г. Штильмарк был не первым, кто изучал в Институте фармакологии Дерптского университета токсины семян клещевина, но ему впервые удалось выделить высаливанием белок из токсичного экстракта семян клещевина, исследовать его и дать ему название “рицин” по названию клещевина *Ricinus communis*. В лаборатории его шефа и директора института Рудольфа Коберта (1852–1922) проводились исследования влияния различных токсинов на организм животных, их кровь и эритроциты. Г. Штильмарк обнаружил способность токсинов вызывать агглютинацию эритроцитов, то есть способность индуцировать гемагглютинацию. Таким образом, рицин — это первый из открытых лектинов, относящихся к группе растительных лектинов или фитогемагглютининов.

Надо отметить важный вклад в первые шаги молодой науки лектинологии доктора Рудольфа Коберта. Именно благодаря его энергии и целеустремленности проводили исследования и других природных фитогемагглютининов. Достаточно сказать, что за несколько лет были получены и даже переданы известной химической фирме “Merck” для выпуска такие фитогемагглютинины, как рицин и абрин, по технологии Г. Штильмарка.

Пионерские работы эстонских ученых в области лектинологии на десятилетия определили интересы многих ученых к природе этих веществ и их способности к агглютинации эритроцитов. Последнее свойство привело к открытию еще одного важного свойства некоторых растительных лектинов. Они являются митогенами, то есть веществами, влияющими на циклы клеточного деления. Это очень важное качество фитогемагглютининов используется в экспериментальной биологии, генетике, цитологии

и онкологии. Для этой цели они в основном сейчас производятся и продаются различными фирмами. Лектин под названием “фитогемагглютинин (ФГА)” характеризует все растительные лектины, и в экспериментальной биологии это название закрепилось за лектином, выделенным из семян фасоли обыкновенной *Phaseolus vulgaris*.

Итак, рицин открыл список растительных лектинов. Сейчас этот список очень велик: это и рицин, и абрин, и ФГА, это и КонА – конконавалин – лектин из конского боба *Canavalia ensiformis*, WGA (wheat germ agglutinine) – агглютинин из проростков семян пшеницы и многие другие. Следует сказать, что сам термин “лектин” у фитогемагглютининов появился очень недавно. Ввел его в обиход выдающийся иммунолог У. Бойд в 60-х годах нашего столетия, используя для этого латинское слово “legere” (выбирать). Этим он как бы подчеркивал способность фитогемагглютининов избирательно связываться с теми или иными углеводными рецепторами клеток.

Сейчас, как уже упоминалось выше, лектины выделены и охарактеризованы практически из всех живых организмов от вирусов до человека. Стало даже более или менее ясно, что эти белки служат организму путем влияния на углеводные рецепторы как чужеродных, так и своих клеток или субклеточных структур. Естественно поэтому, хотя бы в общих чертах, разобраться с этими рецепторами, расположенными на поверхности клеточных мембран и клеточных стенок.

НЕМНОГО О КЛЕТОЧНЫХ ПОВЕРХНОСТЯХ

Все клетки похожи друг на друга по принципам структурной организации, и вместе с тем они значительно отличаются биохимическими элементами, составляющими их структуры. Это легко проследить при сравнении организации, структуры клеточной поверхности у про- и эукариотических клеток (прокариотические клетки – это клетки многих микроорганизмов: бактерий, микоплазм, риккетсий, которые не имеют четко оформленного ядра, окруженного ядерной мембраной. Эукариотические клетки – клетки животных, растений, дрожжей – имеют четко оформленные ядра с хромосомным аппаратом).

И те и другие имеют цитоплазматическую мембрану, формирующую поверхностные структуры клетки, функции которой одинаковы как для эу-, так и для прокариотов, однако во многих деталях химической организации они имеют четкие различия. Если образно принять поверхность клетки за “лицо”, то “лица” клеток каждого вида отличаются друг от друга своими особенностями, своими химическими элементами. Суметь отличить эти различия очень важно для понимания состояния клетки. Для этой цели используются многочисленные методы изучения. Исследуют химическую структуру клеточной поверхности, измеряют величину элект-

рического заряда поверхности, ее способность пропускать внутрь или вовне определенные вещества и т.д. Поскольку на поверхности мембраны расположены разнообразные углеводные рецепторы, их детекция специфическими лектинами – важный элемент в диагностике физиолого-биохимического состояния клетки.

Основу структуры клеточной поверхности составляет клеточная (плазматическая) мембрана, состоящая из липидов, липопротеидов, гликолипидов и гликопротеидов, к числу которых относятся так называемые интегральные белки, пронизывающие мембрану и имеющие на внешней стороне мембраны своеобразные олигосахаридные последовательности в виде структур, напоминающих антенны. У эукариотических клеток многоклеточных организмов эти антенны направлены наружу: в межклеточное пространство, если это клетки ткани, или в просвет сосудистых структур, если это клетки эндотелия, и т.д. У прокариотов над плазматической мембраной расположен чаще всего каркас клеточной стенки. Он по каким-то неизвестным нам закономерностям не экранирует (или экранирует не полностью) олигосахаридные цепи антенн. В состав клеточной стенки бактерий, имеющей полисахаридную природу, входят дополнительно олигосахаридные последовательности так называемого О-антигена, который определяет своеобразие структуры клетки, вызывает специфическую реакцию организма животного и человека на инфицирующие его организмы и т.д.

Таким образом, несмотря на схожесть структур плазматических мембран и принципиальную тождественность их функций, у про- и эукариотов есть и значительные различия. Общим является то, что на поверхности клеток имеются олигосахаридные цепи, хранящие свою уникальную структуру для каждой клетки. Знать ее очень важно для понимания работы клетки и ее управления.

Какие же моносахариды чаще всего входят в состав олигосахаридов интегральных белков и О-антигенов? Разнообразие моносахаридов очень велико, однако чаще всего в состав этих олигосахаридов эукариотических клеток входят глюкоза (Glc), N-ацетилглюкоза (NAcGlc), галактоза (Gal), N-ацетилгалактоза (NAcGal), манноза (Man), фукоза (Fuc), N-ацетилнейраминавая или сиаловая кислота (NAcNeu).

Различные моносахара, соединяясь в определенную последовательность, образуют олигосахарид, который присоединяется одним концом к белковой молекуле, погруженной в липидный матрикс мембраны. Топография олигосахаридных остатков по отношению к мембранному белку показана на рис. 3, изображающем молекулу одного из наиболее изученных интегральных белков мембраны эритроцитов человека и животных – гликофорина. Олигосахариды мембранных белков служат своеобразными

убедительно. Таким образом, знакомство с лектинами вирусов помогает значительно продвинуться в понимании механизма возникновения некоторых болезней и разработке эффективных методов защиты от инфекции.

Лектины некоторых микроорганизмов — стрептококков, живущих в полости рта, приводят к формированию “зубного камня”, что доставляет массу забот. Для исследователей знание этих лектинов представляет большую ценность при разработке средств защиты полости рта от болезней. Лектины микроорганизмов, колонизирующих тонкий кишечник человека и животных, определяют форму симбиотического сосуществования макро- и микроорганизмов. Лишившись этих микроорганизмов, мы теряем “друзей” и открываем доступ вредным, патогенным микроорганизмам. Это сфера изучения экологии желудочно-кишечного тракта организма человека, которая очень важна для разработки подходов к долголетию, здоровой жизни человека.

Несомненна и роль лектинов животного организма в узнавании клетками отдельных тканей, которые связаны с действием на них таких биологически активных соединений, как гормоны. Гормоны регулируют обмен веществ в организме. В совокупности с нервной системой они как бы дирижируют процессами обмена веществ в организмах человека и животных. Роль лектинов в проявлении тех или иных биологических эффектов обусловлена вмешательством их в механизм связывания гормона с тканевыми рецепторами. Это особенно ярко проявляется во влиянии многих растительных лектинов на механизм действия такого важного гормона, как инсулин (инсулин — белковый гормон поджелудочной железы человека и животных, принимающий участие в регулировании обмена углеводов в организме). По данным Кватрекасеса, полученным еще в начале 70-х годов, WGA и ConA обладают способностью связываться с рецепторами инсулина в клетках и тем самым влияют на регуляцию обмена глюкозы в организме животного. Установлено также, что эндогенные лектины могут менять функционирование в мембране так называемых ионных каналов и таким образом воздействуют на серию метаболических реакций. Этим, собственно, и объясняется большая токсичность многих лектинов, и в том числе рицина.

Есть еще одна малоисследованная, но очень интересная роль эндогенных лектинов. Это их роль в акте размножения и начальном этапе развития макроорганизмов — в эмбриогенезе. Что касается размножения, то, как это показано в экспериментах на животных, специфическая адгезия сперматозоидов на поверхности яйцеклетки не проходит без углевод-белкового узнавания с участием эндогенных лектинов. Наиболее изучены в этом отношении так называемые матриксные лектины кортикальных гранул яйцеклеток шпорцевой лягушки — излюб-

ленного объекта эмбриологов. Показано, что они выполняют важную функцию защиты оплодотворенной клетки, делая ее недоступной для других сперматозоидов. Еще более важно исследование роли лектинов в процессах дифференциации оплодотворенной яйцеклетки. Так называемые эмбриональные лектины на различных этапах развития яйцеклетки — дробления, гастрюлы, нейрулы, по данным эмбриологов, — играют важную роль в формировании нормального или аномального организма. Не лежит ли в основе некоторых генетических заболеваний человека и животных дефект, приводящий к нарушению образования некоторых лектинов и их функций?

Важную роль в животном организме играют так называемые лектины клиренса. Это большая группа эндогенных лектинов с различной углеводной специфичностью, способных “улавливать” в основном в печени те или иные фрагменты углеводных структур, которые подлежат дальнейшей деградации. Система из этих лектинов служит своеобразным фильтром для улавливания и утилизации ненужных для организма структур.

Однако мы увлеклись экскурсом в область лектинологии животного организма, забыв о растениях, а ведь история получения лектинов началась с исследования именно растительного организма. Обращает на себя внимание то обстоятельство, что, несмотря на наличие лектинов в различных частях растительного организма, большее количество их сосредоточено в семенах. Так, в семенах конского боба конканавалина А содержится от 23 до 35% по отношению к общему содержанию белка, много лектина в семенах чечевицы и фасоли. В некоторых случаях содержание лектина нарастает в процессе прорастания семян. Лектины семян имеют важное значение в регуляции деления клеток при прорастании, в том числе в процессе органогенеза, при котором из семени формируется растение. Широко распространены представления о том, что лектины корневой системы выполняют роль защитников растений от болезнетворных микроорганизмов и низших грибов, с избытком находящихся в почве. Однако можно привести пример, когда лектины патогенов, по моему мнению, обладают свойствами факторов агрессии, которые позволяют микробам или низшим грибам атаковать растения.

Очень интересно направление исследования молекулярных механизмов “инфицирования” растений азотфиксаторами — микроорганизмами, связывающими атмосферный азот. Известно, что клетки азотфиксирующих организмов рода ризобий, инфицируя корневую систему бобовых растений, вызывают разрастание некоторых участков корней с образованием клубеньков, фиксирующих азот. Эта метаморфоза тканей корня начинается с момента специфического лектин-углеводного взаимодействия (узнавания) определенного микроорганизма с

вполне определенным видом бобового растения. Естественно, что при создании так называемых микробных удобрений необходимо большое внимание уделять этому начальному этапу индуцирования (лектин-углеводному узнаванию), подбирая при разработке новых бактериальных препаратов те микроорганизмы, которые обладают либо специфическими углеводными последовательностями для лектинов растения, либо специфическими лектинами, расположенными поверхностно на бактериальной клетке к углеводным детерминантам растения.

ЛЕКТИНЫ В BIOTEХНОЛОГИИ

Если открыть проспекты ведущих химических и биотехнологических фирм мира, специализирующихся в сфере выпуска биопрепаратов, то можно найти большой перечень лектинов, их производных, меченых лектинов и т.д. Известно, что лектины используются в лабораторном деле для диагностики тех или иных наследственных заболеваний, идентификации некоторых микроорганизмов, в исследовательской работе. Это уже само по себе делает высоким спрос на лектины. Однако лектины в биотехнологии используются и в более прозаической роли – специфических реагентов, избирательно сорбирующих те или иные сложные вещества: гликопротеиды, гормоны, сиалопротеиды и т.д. Таким образом, при помощи препаратов лектинов можно получить ценные вещества, используемые при лечении многих тяжелых заболеваний.

Весьма перспективно создание нового поколения препаратов – своеобразных гибридов лектинов и антител для воздействия на те органы и ткани, где

действие лектина полезно для человека. Одна из таких попыток была недавно сделана в Кёльне доктором Андресом Энгертом. Для лечения рака лимфатических узлов он использовал рицин, “сшитый” с антителами, избирательно доставляющими этот токсичный лектин к опухоли. Конечно, это первые шаги в подобном использовании лектинов, но поэтому они и важны. Лектинология – молодая наука, в ней много работы для тех, кто интересуется молекулярной биологией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. Львов: Вища шк., 1981.
2. Королев Н.П. Функции лектинов в клетках // Итоги науки и техники. Общие проблемы физико-химической биологии. М., 1984. Т. 1.

* * *

Владимир Владимирович Игнатов, доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии и биофизики Саратовского государственного университета, зав. лабораторией биохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, заслуженный деятель науки РФ, вице-президент Российского микробиологического общества. Основные научные интересы: исследование молекулярных механизмов взаимодействия растений и микроорганизмов, лектины, их роль в биохимии и физиологии растительной и микробной клетки.