



УДК 615.272:577.112:592:594:595

© 1994 Н. И. Белогорцева, Р. Г. Оводова, С. В. Мороз,
Н. А. Одинцова*, А. В. Ермак*, Ю. С. Оводов

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕКТИНА ИЗ АСЦИДИИ *Didemnum ternatum*

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток;
* Институт биологии моря ДВО РАН, Владивосток

Ключевые слова: лектин N-ацетилглюкозамина, специфичность, асцидия *Didemnum ternatum*, клетки HeLa.

Лектин из асцидии *Didemnum ternatum* (ДТЛ) выделяли аффинной хроматографией на перекрестно сшитом овальбумине с последующей гель-хроматографией на сефадексе G-100. Молекулярная масса лектина, по данным SDS-электрофореза, составляет 27 кДа. При SDS-электрофорезе в присутствии β-меркаптоэтанола выявляется одна полоса с M 10 кДа. N-Концевая аминокислота — Ala. Выделенный лектин агглютинирует клетки карциномы Эрлиха и трипсинизированные эритроциты человека группы A, B, O. Реакция агглютинации ингибируется GlcNAc, хитоолигосахаридами, дезаилированными гликопротеинами: фетуином α₁-кислым гликопротеином и наиболее интенсивно овальбумином. Анализ углеводных структур ингибирующих гликопротеинов позволяет заключить, что для лектина доминантным моносахаридом в специфическом углеводном участке связывания, вероятно, является бисектный глюкозамин углеводных цепей комплексного и гибридного типа. Необходимое условие связывания лектина с углеводными цепями комплексного типа — отсутствие сиаловых кислот, обычно соединенных с остатками галактозы. Показано, что ДТЛ ингибирует пролиферацию опухолевых клеток HeLa более чем на 40%, а также снижает уровень включения [³H]тимидина в эти клетки. Выявлены значительные морфологические различия контрольных HeLa-клеток и клеток HeLa, обработанных ДТЛ.

Интерес исследователей к лектинам обусловлен их уникальными свойствами: высокой избирательностью связывания с углеводными участками, а также сочетанием углевод-рецепторной активности с токсичностью, митогенной и иммуностимулирующей активностью [1, 2]. Лектины широко используют для исследования структуры и функций гликозилированных компонентов поверхности опу-

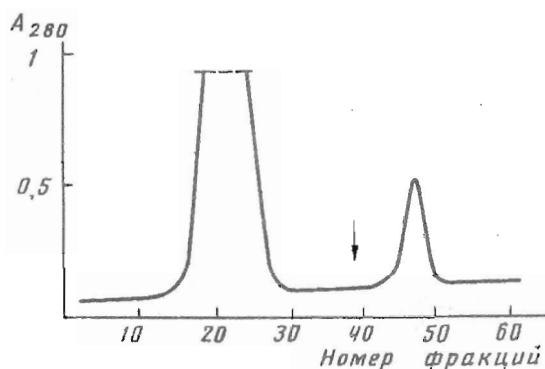


Рис. 1. Аффинная хроматография экстракта из асцидии *D. ternatum* на колонке (3×15 см) перекрестно сшитого овальбумина. Стрелкой показано начало элюции 50 мМ глицин-НCl, рН 3,8. Объем фракции 5 мл

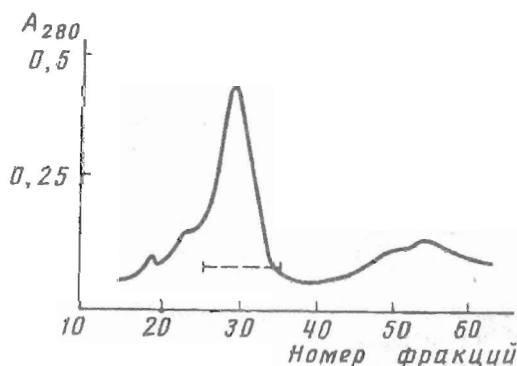


Рис. 2. Гель-фильтрация лектина на колонке (1,5×90 см) с сефадексом G-100, уравновешенной буфером А. Скорость элюции 18 мл/ч, объем фракции 3 мл. Отмечены фракции, проявляющие агглютинирующую активность

холевых клеток [3]. В настоящее время морские организмы относятся к числу сравнительно новых источников лектинов. Хотя вопрос о физиологической роли лектинов морских организмов до настоящего времени остается нерешенным, исследования в этой области показывают, что они могут участвовать в транспорте углеводов и кальция, осуществлять контроль за клеточной агрегацией [4, 5].

Предполагают, что лектины беспозвоночных играют важную роль в иммунобиологическом узнавании и принимают непосредственное участие в таких неспецифических иммунных реакциях, как агглютинация, опсонизация и лизис [6, 7].

Нами проведено исследование лектина из асцидии *Didemnum ternatum*, собранной в южном регионе Тихого океана. Измельченную асцидию экстрагировали буферным раствором с рН 7,4, экстракт диализовали и лиофильно сушили. Полученный экстракт асцидии агглютинирует трипсинизированные эритроциты барана, человеческие эритроциты группы А, В, О, клетки карциномы Эрлиха. Наиболее эффективная агглютинация наблюдается с клетками карциномы Эрлиха. Предварительные результаты по ингибированию агглютинации и проведенные в соответствии с этим эксперименты по выбору аффинного сорбента для очистки ДТЛ показали, что наиболее эффективен в качестве сорбента перекрестно сшитый овальбумин.

Экстракт асцидии наносили на колонку с перекрестно сшитым овальбумином (рис. 1). Лектин элюировали кислым буфером (рН 3) и дополнительно очищали гель-фильтрацией на сефадексе G-100 (рис. 2).

Гомогенность выделенного лектина подтверждали с помощью электрофореза

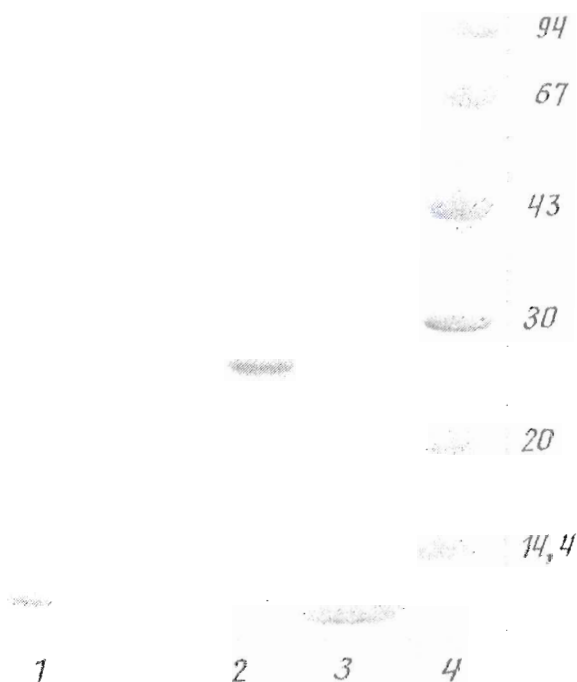


Рис. 3. SDS-электрофорез ДТЛ (2), ДТЛ, восстановленного β -меркаптоэтанолом (1) и прогретого при 100°C (3). 4 — набор стандартных белков (Pharmacia), сверху вниз (M , кДа): фосфорилаза В, BSA, овальбумин, карбогидраза, трипсиновый ингибитор, α -лактальбумин

в градиенте пористости полиакриламидного геля в присутствии додецилсульфата натрия (рис. 3). По данным электрофореза, молекулярная масса ДТЛ составляет 27 кДа. Образец после предварительного прогревания при 100°C , а также в присутствии β -меркаптоэтанола дает одну полосу при электрофорезе, соответствующую $M \approx 10$ кДа. Эти результаты указывают на наличие в молекуле лектина трех субъединиц, связанных между собой нековалентными связями. Гомогенность ДТЛ подтверждают данные N-концевого аминокислотного анализа. В качестве единственной N-концевой аминокислоты определен аланин.

ДТЛ эффективно агглютинирует клетки карциномы Эрлиха и не взаимодействует с нативными эритроцитами барана и человеческими эритроцитами групп А, В, О в концентрации ниже 1 мг/мл, но агглютинирует с титром 1 : 1024 соответствующие эритроциты, обработанные трипсином.

Как показывают результаты исследования ингибирования реакции гемоглютинации (таблица), высокой ингибирующей активностью обладают глюкозамин и хитоолигосахариды, причем глюкозамин, хитобиоза и хитотриоза не столь значительно различаются по своей активности. Самой высокой ингибирующей активностью в ряду гликопротеинов обладает овальбумин. Данные по ингибированию гликопротеинами свидетельствуют о том, что нативные гликопротеины в отличие от десалилированных не ингибируют реакцию гемоглютинации в указанных концентрациях. Для выяснения различий в ингибировании

Моно-, олигосахариды, гликопротеиды	Минимальная ингибирующая концентрация
	мМ
<i>D</i> -Man	> 50
<i>D</i> -Gal	> 50
<i>L</i> -Fuc	> 50
<i>D</i> -Gal β 1-OMe	> 50
<i>D</i> -GalNAc	> 50
Лактоза	> 50
Мелибиоза	> 50
<i>D</i> -GlcNAc	0,35
Ди-N-Ac- β -хитобиоза	0,15
Три-N-Ac- β -хитотриоза	0,2
	мг/мл
Фетуин	> 3
α_1 -Кислый гликопротеин	> 3
Муцин	> 3
Овальбумин	0,008
Десиалилированный фетуин	0,03
Десиалилированный α -кислый гликопротеин	0,5
Десиалилированные углеводные цепи α_1 -кислого гликопротеина	0,2
Десиалилированный муцин	> 3
Десиалилированный фетуин, обработанный проназой	> 1
Овальбумин, обработанный проназой	0,008

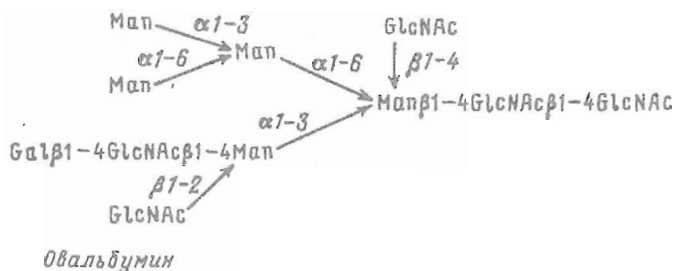
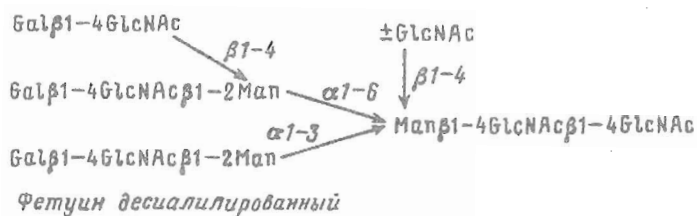
мы рассмотрели структурные варианты главных углеводных цепей ингибирующих гликопротеинов: овальбумина, десиалилированных α_1 -кислого гликопротеина и фетуина.

Приведенные олигосахаридные структуры различаются концевыми моносахаридными остатками (в α_1 -кислом гликопротеине и фетуине — Gal, в овальбумине — Man). Однако Gal и Man не ингибируют гемагглютинацию и не являются доминантными моносахаридами. Второе отличие структуры овальбумина — присутствие глюкозамина, связанного β -1,4-связью с β -связанным остатком маннозы, так называемого «бисектного» глюкозамина. Содержание таких цепей в α_1 -кислом гликопротеине и фетуине значительно ниже. С другой стороны, десиалилированный фетуин обладает гораздо более высокой ингибирующей активностью, чем десиалилированный α_1 -кислый гликопротеин (таблица), и, по-видимому, его относительно высокая ингибирующая активность обусловлена иными, чем у овальбумина, факторами. После обработки проназой десиалилированный фетуин в концентрации 1 мг/мл не ингибирует реакцию агглютинации, в то время как овальбумин сохраняет свою активность. Следовательно, высокая ингибирующая активность фетуина, вероятно, обусловлена в основном белковой составляющей.

ДТЛ оказался перспективен при исследовании трансформированных клеток, которые, как правило, отличаются повышенным содержанием углеводных цепей гибридного типа.

Действие ДТЛ на культуру опухолевых клеток HeLa оценивали по включению [3 H]тимидина в клетки, клеточной пролиферации и морфологическому состоянию клеток.

Как видно из рис. 4, уровень включения [3 H]тимидина в клетки, культивируемые с ДТЛ, а также клеточная пролиферация ниже, чем в контроле. Влияние ДТЛ на клеточную морфологию определяли, анализируя клетки на сканирующем



электронном микроскопе. Выявлены существенные изменения поверхности клеток, их формы и размера. Исследование топографии поверхности контрольных клеток (рис. 5а) показало, что в большинстве случаев клетки хорошо распластываются на подложке и на этом фоне четко выделяются более выпуклые округлые клетки. Примечательно, что края выпуклых клеток приподняты над общей поверхностью клеточного слоя, в результате чего, по-видимому, ослабевает контакт с соседними клетками.

Клетки, культивируемые с ДТЛ, значительно увеличились в размерах в связи с тем, что они сильно распластаны на подложке, образуют общий клеточный пласт (рис. 5б). У них более шероховатая поверхность. В большинстве случаев можно наблюдать смыкание клеточных границ. Необходимо отметить, что именно восстановление этих контактов, возникающее в связи с увеличением размеров и изменением количественных соотношений между компонентами поверхности и цитоплазмы клеток, является одним из механизмов нормализации опухолевых клеток [8].

Экспериментальная часть

В работе использовали моно- и олигосахариды (Merck), фетуин и десиацелилированный фетуин (Sigma). Хитоолигосахариды были любезно предоставлены ст. науч. сотр. ТИБОУ В. И. Горбачом.

Общее содержание белка и углеводов определяли как описано в работах [9, 10], N-концевые аминокислоты — дансильным методом [11]. Углеводные цепи α_7 -кислого гликопротеина отщепляли по методу Лихошерстова и соавт. [12].

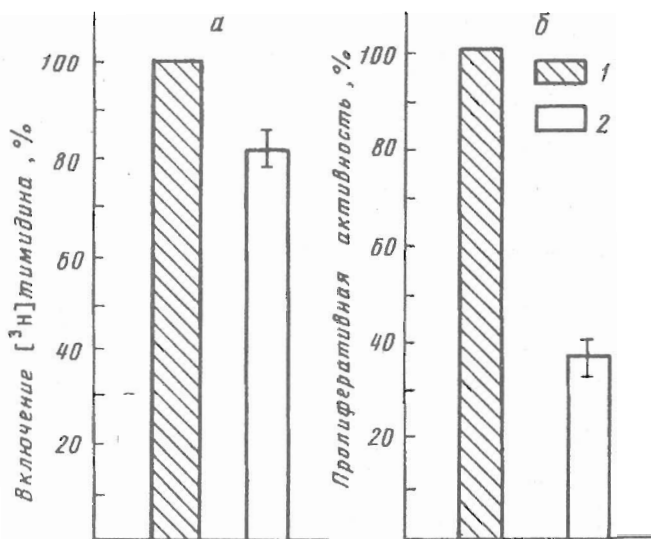


Рис. 4. Относительный уровень включения [^3H]тимидина в клетки HeLa (а) и уровень клеточной пролиферации (б) клеток HeLa (в %) после 3-суточной инкубации с ДТЛ (1 — контроль, 2 — ДТЛ)

SDS-электрофорез проводили по методу Лэммли [13], используя 7—20% градиент ПААГ в присутствии 0,1% SDS.

В работе использовали буферные растворы: 50 мМ трис-НСl с 150 мМ NaCl, pH 7,4 (А) и 10 мМ фосфат натрия с 150 мМ NaCl, pH 7,4 (Б).

Получение аффинного сорбента [13]. 6 г овальбумина растворяли в 120 мл 0,2 М ацетатного буфера (pH 5), затем по каплям при осторожном перемешивании добавляли 40 мл 6,5% глутарового альдегида. Смесь оставляли на 3 ч при 20° С. Гель гомогенизировали, пропуская через иглу № 18, и отмывали рабочим буфером.

Десульфирование гликопротеинов проводили 1,5 ч при 80° С в растворе муравьиной кислоты (pH 2,1). Раствор охлаждали до 20° С, диализовали против дистиллированной воды и лиофильно сушили.

Приготовление экстракта из асцидии *D. termatum*. Животных измельчали сразу после сбора. Биомассу заливали буферным раствором А и гомогенизировали при 16 000 об/мин. Супернатант диализовали против дистиллированной воды (3×12 ч) и лиофильно сушили.

Выделение лектина ДТЛ. а) Аффинная хроматография. 500 мг лиофильного экстракта растворяли в 25 мл буферного раствора А, содержащего 5 мМ CaCl₂, и наносили на аффинный сорбент (3×15 см), приготовленный на основе перекрестно сшитого овальбумина и уравновешенный указанным буфером. После нанесения раствора колонку промывали буфером до исчезновения поглощения при 280 нм. Лектин элюировали 50 мМ глицин-НСl-буфером (pH 3). Колонку промывали со скоростью 20 мл/ч (рис. 1). Элюат, содержащий лектин, диализовали против дистиллированной воды и лиофильно сушили. Выход лектинсодержащей фракции составил 40 мг.

б) Гель-фильтрация на сефадексе G-100. 20 мг лиофилизата, полученного на предыдущей стадии, растворяли в 3 мл буфера А и хроматографировали на колонке с сефадексом G-100 (рис. 2). Элюцию проводили этим же буфером. Собирали фракцию, агглютинирующую трипсинизированные эритроциты. Очищенную фракцию лектина диализовали против бидистиллированной воды и лиофилизировали. Выход ДТЛ составил 15 мг.

Определение агглютинирующей активности. Реакцию агглютинации проводили в фосфатном буфере в U-образных планшетах для иммунологических

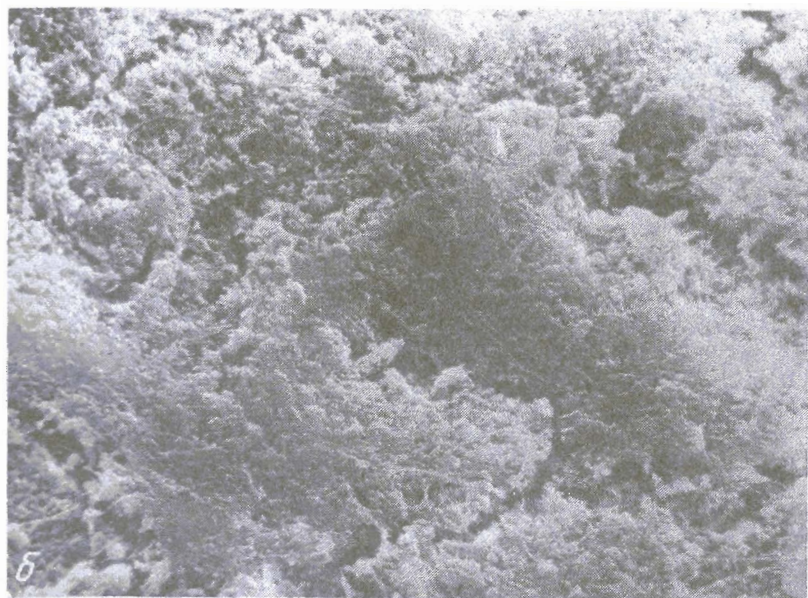
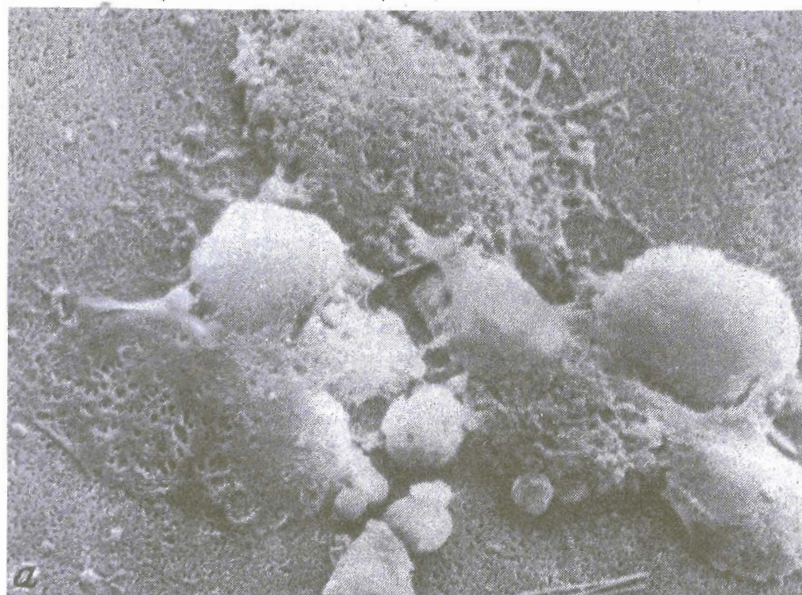


Рис. 5. Клетки HeLa при исследовании с помощью сканирующего электронного микроскопа (увеличение 1×1500): а — в исходном состоянии, б — после инкубации с ДТЛ

реакций. В лунку добавляли 25 мкл лектинсодержащего раствора (1 мг/мл) и готовили ряд двукратных разбавлений. Затем добавляли 25 мкл 2% суспензии эритроцитов или суспензии клеток карциномы Эрлиха. Реакцию агглютинации оценивали через 45 мин с помощью светового микроскопа. Предельное разведение, при котором наблюдалась агглютинация, соответствовало значению титра данного лектина.

Ингибирование реакции гемагглютинации. Предварительно готовили ряд двукратных разведений ингибирующих сахаров и гликопротеинов. Параллельно

проводили титрование раствора лектина. В реакции ингибирования использовали раствор лектина с гемагглютинационным титром 4. Инкубировали 25 мкл тестируемого раствора и 25 мкл ингибирующего раствора при 20° С в течение 30 мин. Затем добавляли 25 мкл 2% суспензии эритроцитов. Значение минимальной концентрации ингибирующего раствора, который отменяет реакцию агглютинации, соответствует ингибирующей активности данного сахара или гликопротеина.

Энзиматическая обработка эритроцитов. 10 мл 10% суспензии эритроцитов в буфере Б обрабатывали 3 ч при 37° С 2 мг трипсина (Spofa, Чехо-Словакия), затем отмывали 3 раза буфером и готовили 3% суспензию эритроцитов.

Культивирование клеточной культуры HeLa. Клеточную культуру монослойной сублинии рака шейки матки HeLa-M (Всесоюзная коллекция клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург) культивировали в CO₂-инкубаторе при 37° С на среде Дульбекко (DMEM, Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАН) с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота (Difco) и 50 мг/мл гентамицина (Serva). Клетки высевали на 24-луночные пластины (Linbro) в концентрации 50 000 клеток на 1 лунку. Стерильный раствор ДТЛ добавляли в лунки до конечной концентрации 2,5 мкг/мл.

Включение [³H]тимидина. Влияние используемых веществ на синтез ДНК клетками HeLa определяли по уровню включения [³H]тимидина. После 3-суточной инкубации клеток в среду добавляли [³H]тимидин (уд. акт. 5 мкКи/мл), оставляли на 1,5 ч при 37° С. Затем среду с меткой сливали. После культивирования клеток в течение 15 мин в среде, содержащей холодный тимидин (50 мкг/мл), клетки снимали смесью 0,1% трипсина с версеном и содержимое лунок переносили количественно на микрофильтры (синяя лента), промывали 10% трихлоруксусной кислотой для удаления неспецифически связанного с клетками радиоактивного материала с последующей фиксацией этиловым спиртом. Фильтры переносили в кварцевые кюветы для счета, содержащие по 5 мл толуольного сцинтиллятора, и регистрировали активность с помощью счетчика LS-30 (Intertechnique, Франция).

Подсчет клеточной пролиферации. После 3-суточной инкубации среду из лунок отсасывали вакуумным насосом и прикрепленные клетки промывали смесью 0,1% трипсина с версеном, а затем снимали их с поверхности лунок, инкубируя в этом растворе 1—3 мин при 37° С. Подсчет клеток проводили в камере Горяева.

Сканирующая микроскопия. При получении препаратов для сканирующего электронного микроскопа клетки HeLa высевали на фильтры (Millipor, диаметр пор 0,22 мкм), вложенные в лунки плат. Предварительная подготовка фильтров включала их трехразовое кипячение в дистиллированной воде для удаления токсичных для клеток веществ, образовавшихся при производстве фильтров. В конце эксперимента, после 3-суточной инкубации, фильтры перекладывали в другую плату, заливали 2,5% глутаровым альдегидом, приготовленным на буфере Б, оставляли на 2,5—3 ч. После фиксации глутаральдегидом фильтры на 1,5—2 ч заливали 50% этанолом. Затем следовала двукратная промывка 70% этанолом (по 15 мин). Фильтры хранили в 70% этаноле при 4° С. Фильтры дегидрировали в 96% этаноле и сушили переходом критической точки CO₂ на установке HCP-2 (Hitachi). Высушенные образцы монтировали на предметном столике и напыляли золотом в вакууме. Просмотр и съемку образцов проводили на сканирующем электронном микроскопе JSM-25-S-11 («Joel», выпуск 1983 г.) под углом 45°.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Godal A., Fodstad O., Pihl A. // *Cancer. Res.* 1987. V. 47. P. 6243—6247.
2. Hajto T., Hostanska K., Vehmeyer K., Gabius H. J. // *Lectins and Glycoconjugates in Oncology* / Eds H. J. Gabius, G. A. Nagel. B.: Springer-Verlag, 1988. P. 199—206.
3. Hakomori S. I. // *Cancer. Res.* 1985. V. 45. P. 2405—2414.
4. Ratcliffe N. A., Rowley A. F., Fitzgerald S. W., Rhodes C. P. // *Inter. Rev. Cytol.* 1985. V. 97. P. 133—350.
5. Hanisch F. G., Saur A., Müller W. E. G., Conrad J., Uhlenbruck G. // *Biochim. et biophys. acta.* 1984. V. 801. P. 388—393.

6. Yeaton R. W.//Dev. Comp. Immunol. 1981. V. 5. P. 301—402.
7. Yamasaki M., Kisugi J., Kamiya H.//Chem. Pharm. Bull. 1989. V. 37. P. 3343—3346.
8. Бершадский А. Д., Ставровская А. А.//Цитология. 1988. Т. 30. С. 1123—1131.
9. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randal R. J.//J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265—275.
10. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F.//Anal. Chem. 1956. V. 28. № 2. P. 350—356.
11. Ганкина Э. С., Королева Е. М., Беленький Б. Б.//Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 4. С. 465—490.
12. Likhoshesterov L. M., Novikova O. S., Piskarev V. E., Trusikhina E. E., Derevitskaya V. A., Kochetkov N. K.//Carbohydr. Res. 1988. V. 178. № 1. P. 155—163.
13. Laemmli U. K.//Nature. 1970. V. 227. P. 680—685.

Поступила в редакцию
11.X.1993
После доработки
28.III.1994

N. I. Belogortseva, R. G. Ovodova, S. V. Moroz, N. A. Odintsova*,
A. V. Yermak*, Yu. S. Ovodov

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A STRUCTURALLY UNUSUAL LECTIN FROM ASCIDIAN *Didemnum ternatum* (DTL)

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry,
Far East Division, Russian Academy of Sciences, Vladivostok;*
* *Institute of Marine Biology, Far East Division,
Russian Academy of Sciences, Vladivostok*

Key words: lectin, N-acetylglucosamine, specificity, ascidian *Didemnum ternatum*, HeLa cells.

DTL was isolated from the *Didemnum ternatum* colonial ascidian and purified by affinity chromatography on cross-linked ovalbumin followed by gel-filtration on Sephadex G-100. SDS-PAGE of the preparation showed a major intense band with a relative mol. wt. of ca. 27 kDa. In the presence of 2-mercaptoethanol, DTL gave rise to a single band of 10 kDa. The lectin isolated was found to agglutinate Erlich's carcinoma cells and trypsinized human A, B, O erythrocytes, the hemagglutination being inhibited by GlcNAc, chitobiose, desialylated glycoproteins. Comparison of the sugar moieties of the glycoproteins used as inhibitors led to suggestion that the specific sugar binding site contains, as a dominant sugar, a «bisecting» glucosamine attached through a β -1,4-linkage to the β -linked mannose residue of N-glycosidic chains of a complex or hybrid type. An absence of sialic acid residues linked with galactose residues appeared to be necessary for binding DTL with the complex-type sugar chains. DTL inhibits proliferation and reduces DNA biosynthesis ($[^3\text{H}]$ thymidine incorporation) in tumour cells (HeLa). Principal morphological differences were detected to occur between intact and DTL-treated HeLa cells.