



УДК 547.962.5:577.458.22

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ГАЛАКТОЗОСВЯЗЫВАЮЩИХ ЛЕКТИНОВ ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© 1996 г. Е. М. Рапопорт, Л. С. Жигис[#], Е. Ю. Корчагина, Т. В. Овчинникова, В. П. Зубов, Н. В. Бовин

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

Поступила в редакцию 14.11.95 г.

Из сыворотки крови человека выделены два галактозосвязывающих лектина, СЛ1 и СЛ2. Двухстадийной аффинной хроматографией на сорбентах, содержащих дисахариды Gal β 1–3GlcNAc β (Le^c) и Fuc α 1–2Gal β (Hdi), получены препараты со степенью очистки 4000–6000 раз, выход СЛ1 и СЛ2 составляет 6.9 и 4.7 мкг соответственно на 1 мл сыворотки крови. С помощью электрофореза показано, что оба лектина представляют собой олигомеры с молекулярной массой около 440 кДа, молекулярная масса субъединицы составляет около 67 кДа. Углеводную специфичность лектинов определяли методом ингибирования гемагглютинации с использованием моно- и олигосахаридов. Показано, что оба лектина относятся к группе Gal/GalNAc-связывающих, но различаются между собой по взаимодействию с олигосахаридами. Так, СЛ1 проявляет максимальную активность по отношению к дисахариду Gal β 1–3GalNAc β (в виде 4-нитрофенилгликозида), 6'-сиалиллактозе, к дисахаридам Fuc α 1–3Gal β и Gal α 1–3Gal β , а СЛ2 – к GalNAc α и его производным, а также к дисахариду Hdi.

Ключевые слова: сыворотка крови человека, галактозосвязывающие лектины, углеводная специфичность, аффинная хроматография.

Лектины благодаря своей способности взаимодействовать с гликоконъюгатами широко применяются в различных областях биохимии, клеточной биологии, иммунологии: при изучении клеточной поверхности, при типировании клеток крови, для митогенной стимуляции лимфоцитов, при выделении и очистке углеводсодержащих биополимеров, в гистологии и онкопатологии [1].

За последние 10 лет появилось немало работ, посвященных выделению и изучению физико-химических свойств лектинов из сыворотки крови различных животных и человека. Биологическая роль этих лектинов еще недостаточно изучена, хотя имеются данные, что они участвуют в регуляции иммунного ответа путем активации системы комплемента по классическому пути [2, 3], обладают бактерицидным действием по отношению к некоторым видам болезнетворных бактерий [4] и инaktivируют действие некоторых вирусов [5]. В настоящее время из сыворотки крови человека и животных выделены маннансвязывающие белки (МВР): МВР [6–8], коровий сывороточный лектин [9], С-реактивный белок [9], амилоид Р [9]. Для всех этих белков определена аминокислотная последовательность и изучено строение углеводсвязывающего домена. Сравнительно недавно были опубликованы данные по выделению и характеристике маннанспецифичного лектина из сыворотки крови быка (CS 43) [10] и лектина, обладающего

высокой специфичностью по отношению к лактозамину, трисахариду Н (тип 2) и 2'-фукозиллактозе, из сыворотки крови кролика [11].

В этой работе приводятся данные по выделению и характеристике двух лектинов из сыворотки крови человека. Для выделения лектинов использовали дисахариды Gal β 1–3GlcNAc β (Le^c) (для лектина СЛ1) и Fuc α 1–2Gal β (Hdi) (для лектина СЛ2), иммобилизованные на макропористом стекле (МПС) через полиакриламидный спейсер [12].

Результаты аффинной хроматографии сыворотки крови и анализа полученных фракций с помощью реакции гемагглютинации (РГА) и по содержанию белка показаны на рис. 1 и в табл. 1. Из приведенных данных следует, что двухстадийная аффинная хроматография позволяет получить высокоочищенные препараты СЛ1 и СЛ2 (степень очистки в случае СЛ1 составляет 4100 раз, в случае СЛ2 – 6100). Выход СЛ1 и СЛ2 по белку составляет 6.9 и 4.7 мкг соответственно на 1 мл сыворотки крови. Значительное снижение титра в РГА во фракциях СЛ1 и СЛ2 по сравнению с исходной сывороткой можно объяснить удалением в процессе очистки других компонентов сыворотки крови, обладающих, как и лектины, гемагглютинирующей активностью (например, иммуноглобулины [1]).

Анализ полученных препаратов СЛ1 и СЛ2 методом нативного электрофореза в блоке ПААГ (рис. 2а, 2, 5) показал, что молекулярный вес как СЛ1, так и СЛ2 составляет 440 кДа. При

[#] Автор для переписки.

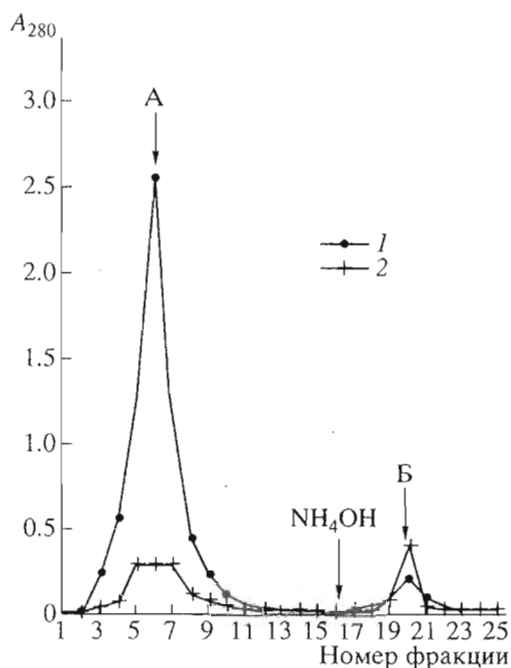


Рис. 1. Аффинная хроматография сыворотки крови человека на колонках Le^c -МПС и Hdi -МПС (1×9 см) (1) и рехроматография фракции Б в тех же условиях (2). Элюцию проводили в 1.5% NH_4OH в PBS, pH 9. Фракция А – сопутствующие белки, фракция Б – СЛ1 или СЛ2.

электрофорезе в присутствии SDS в восстанавливающих условиях (рис. 2б) для СЛ1 наблюдаются основная зона (67 кДа) и минорные (28 и 50 кДа) (рис. 2б, 6, 7). Полученные данные позволяют предположить, что СЛ1 представляет собой олигомер, состоящий из 6–7 субъединиц с молекулярной массой 67 кДа. При электрофорезе СЛ2 в восстанавливающих условиях наблюдается картина,

аналогичная СЛ1 (рис. 2б, 4, 5). По-видимому, СЛ2 также представляет собой олигомер, состоящий из нескольких субъединиц с M 67 кДа. Наличие минорных зон в препаратах СЛ1 и СЛ2 можно объяснить либо более сложной структурой олигомерного комплекса, либо присутствием в образце незначительного количества примесей.

Углеводную специфичность лектинов определяли методом ингибирования гемагглютинации. При подборе оптимальных условий для проведения РГА нами была исследована возможность использования эритроцитов из крови различных животных (барана, мыши, кролика). В данной работе были использованы эритроциты кролика, позволяющие получить наиболее высокий титр в РГА.

Максимальную ингибирующую активность среди выбранных нами моносахаридов для обоих лектинов проявляют α -GalNAc (0.5 и 0.02 мМ соответственно) и β -гликозиды GalNAc (1.1 и 2.0 мМ соответственно). Полученные данные позволяют предположить, что оба лектина относятся к семейству галактозосвязывающих лектинов.

Для изучения более детальной специфичности СЛ1 и СЛ2 были взяты олигосахариды с наиболее типичными для гликоконъюгатов человека Gal- и GalNAc-содержащими фрагментами, как терминальными, так и внутренними.

Олигосахаридная специфичность СЛ1

Ингибирование РГА рядом синтетических Gal-содержащих олигосахаридов показало, что СЛ1 проявляет высокую аффинность относительно β -Gal- и β -GalNAc-производных (табл. 2). Так, связывание с $Gal\alpha 1-3Gal\beta$ (В-дисахаридом) на 2 порядка выше, чем с гликозидом β -GalOMe. Введение еще одного моносахаридного остатка в

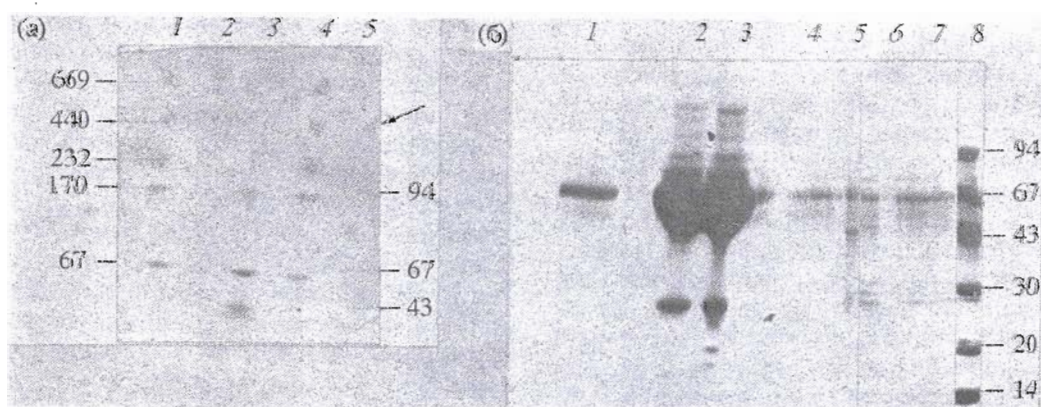


Рис. 2. а – электрофорез в ПААГ в нативных условиях: 1, 4 – стандартная смесь высокомолекулярных белков с известной молекулярной массой (цифры слева), 2 – фракция Б (СЛ1), см. рис. 1, 3 – стандартная смесь низкомолекулярных белков с известной молекулярной массой (цифры справа), 5 – фракция Б (СЛ2); б – электрофорез в ПААГ-SDS в восстанавливающих условиях: 1 – фракция А (хроматография на Hdi -МПС), 2 – образец сыворотки крови до нанесения на колонку, 3 – фракция А (хроматография на Le^c -МПС), 4 – фракция Б (СЛ2) после рехроматографии, 5 – фракция Б (СЛ2), 6 – фракция Б (СЛ1), 7 – фракция Б (СЛ1) после рехроматографии, 8 – стандартная смесь низкомолекулярных белков с известной молекулярной массой (цифры справа).

Таблица 1. Аффинная хроматография лектинов из сыворотки крови человека на колонках Le^c-МПС и Hdi-МПС

Образец	Сорбент	Объем образца, мл	Содержание белка в образцах,		Выход по белку, %	Степень очистки по содержанию белка, кратность	Титр в РГА
			мг/мл	мг			
Сыворотка крови		40.0	2.875	115.0	100.00		64
Фракция СЛ1	Le ^c -МПС	20.0	0.0069	0.1380	0.12	833	8
Фракция СЛ2	Hdi-МПС	15.0	0.008	0.126	0.11	913	4
Рехроматография							
Фракция СЛ1	Le ^c -МПС	10.0	0.00276	0.0276	0.024	4167	8
Фракция СЛ2	Hdi-МПС	8.0	0.00236	0.0189	0.016	6085	4

Таблица 2. Ингибирование гемагглютинации лектинов СЛ1 и СЛ2 моносахаридами и синтетическими олигосахаридами

Ингибитор*	Минимальная концентрация углевода, требуемая для полного ингибирования РГА, мМ	
	СЛ1	СЛ2
GalNAc α -sp	0.50	0.02
GalNAc β -sp	1.10	2.00
α -ManOMe	н. и. (2.00)**	н. и. (2.00)
Fuc	3.00	3.00
β -GalOMe	16.00	125.00
Man	31.00	62.50
Glc	н. и. (50.00)	н. и. (50.00)
Gal β 1-3GalNAc β -ONp	0.02	0.06
Fuc α 1-3Gal β -sp ₁	0.04	н. и. (0.58)
6'-SiaLac	0.10	0.20
B _{di} : Gal α 1-3Gal β -sp ₁	0.16	0.32
H (тип 1):	0.22	н. и. (0.78)
Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β -sp ₁		
Fuc α 1-3GlcNAc β -sp	0.22	н. и. (0.92)
A _{tri} : GalNAc α 1-3- Fuc α 1-2-Gal β -sp ₁	0.40	0.78
LacNAc β	0.46	0.22
F _s : GalNAc α 1-3GalNAc β -sp	0.46	0.92
B _{tri} : Gal α 1-3- Fuc α 1-2-Gal β -sp ₁	0.46	0.46
T _{$\alpha\beta$} : Gal α 1-3GalNAc β -sp ₁	0.46	0.46
SiaLe ^x : Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4- Fuc α 1-3-GlcNAc β -sp ₁	0.58	0.58
Le ^c : Gal β 1-3GlcNAc β -sp	0.58	0.58
3'SiaLac	0.72	0.80
H (тип 2):	0.78	н. и. (0.78)
Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β -sp ₁		
TF: Gal β 1-3GalNAc α -ONp	0.92	0.06
T _{$\alpha\alpha$} : Gal α 1-3GalNAc α -sp	0.94	0.12
Fuc α 1-4GlcNAc β -sp	н. и. (0.94)	н. и. (0.46)
Gal β 1-3Gal β -sp	н. и. (0.94)	0.24
Fuc α 1-2Gal β -sp	н. и. (1.06)	0.05
Lac	9.00	2.00

* Lac – лактоза, Man – D-манноза, Fuc – L-фукоза, Gal – D-галактоза, Glc – D-глюкоза, sp = OCH₂CH₂CH₂NHCOCF₃, sp₁ = OCH₂CH₂CH₂NH₂, ONp = 4-нитрофенил.

** н. и. (...) – отсутствие ингибирования при данной концентрации углевода.



(В-трисахарид) приводит к снижению активности в 3 раза по сравнению с В-дисахаридом (табл. 2). Взаимодействие с 6'-сиалиллактозой в 8 раз сильнее, чем с 3'-сиалиллактозой, и в 90 раз выше по сравнению с незамещенной лактозой. Агглютинация эритроцитов ингибируется низкими концентрациями трисахаридов Н (тип 1) ($\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta\text{-sp}_1$) и Н (тип 2) ($\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta\text{-sp}_1$), причем внутренние их фрагменты $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}$ и $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ сохраняют высокую активность, а терминальный дисахарид $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta\text{-sp}$ заметно менее активен. Интересно, что СЛ1 ингибируется олигосахаридом, не содержащим Gal или GalNAc, а именно дисахаридом $\text{Fuc}\alpha 1-3\text{GlcNAc}\beta\text{-sp}$. Аффинность СЛ1 к Le^c -дисахариду ($\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta\text{-sp}$), с помощью которого лектин выделяли методом аффинной хроматографии, примерно в 30 раз ниже, чем при взаимодействии с дисахаридом $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\beta\text{-sp}_1$. $\text{Fuc}\alpha 1-3\text{Gal}\beta\text{-sp}_1$ является одним из самых сильных ингибиторов (0.04 мМ), в то время как активность его 1-2-изомера намного меньше.

Самым сильным из изученных ингибиторов является β -Np-гликозид дисахарид $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$. Усиление активности ароматическим агликоном позволяет предположить, что эндогенный контррецептор СЛ1 (если он существует) узнает более сложный олигосахарид или гликоконъюгат, причем остаток нитрофенила имитирует его пока еще не идентифицированный фрагмент. Эта структура может быть расширена и в "другую сторону", если учесть, что сиалирование или фукозилирование терминальной галактозы увеличивает аффинность. Таким образом, минимальный по размеру и в то же время максимальный по активности фрагмент, по-видимому, можно определить как $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\beta$.

Олигосахаридная специфичность СЛ2

Специфичность СЛ2 охарактеризована с помощью того же набора синтетических олигосахаридов, что и СЛ1 (табл. 2). Доминантным моносахаридным остатком, так же как и в случае СЛ1, является GalNAc. Принципиальное отличие заключается в том, что любые более сложные из изученных производных GalNAc – дисахариды и трисахариды – были заметно менее активны. В ряду наиболее сильных ингибиторов находятся также два производных галактозы – Н-дисахарид и 6'-сиалиллактоза (0.05 и 0.2 мМ соответственно) и два производных GalNAc: дисахариды – TF и T_{α} (0.06 и 0.12 мМ соответственно). 3'-Сиалиллактоза и тетрасахарид, SialLe^x малоактивны как в отношении СЛ2, так и к СЛ1. Дисахарид $\text{Fuc}\alpha 1-3\text{GlcNAc}\beta\text{-sp}$, не имеющий D-галактофрагмента, активен по отношению к СЛ1, но не связывается с СЛ2.

Таким образом, из сыворотки крови человека выделены два лектина, идентичных по молекулярной массе и, по-видимому, по субъединичной

структуре. По углеводсвязывающим свойствам данные белки можно отнести к семейству Gal-связывающих, так как единственный моносахарид, ингибирующий агглютинацию ими эритроцитов в миллимолярном диапазоне концентраций, – это αGalNAc . Между СЛ1 и СЛ2 наблюдается также значительное сходство в отношении олигосахаридной специфичности – большая часть Gal- и GalNAc-содержащих олигосахаридов имеет близкое сходство к обоим белкам. В то же время ингибирующая активность ряда олигосахаридов по отношению к СЛ1 и СЛ2 существенно различается, что позволяет считать СЛ1 и СЛ2 разными белками.

Для многих растительных и животных лектинов в отличие от других углеводсвязывающих белков (моноклональных антител, ферментов) характерна широкая специфичность, т.е. они с близкой аффинностью связывают олигосахариды, не имеющие очевидного структурного и конформационного подобия. СЛ1 и СЛ2, первичная характеристика которых приведена в данном кратком сообщении, в этом смысле не являются исключением. Связана ли полиспецифичность данных лектинов – компонентов сыворотки крови – с разнообразием углеводных цепей, циркулирующих в крови гликоконъюгатов, предстоит выяснить.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовались моносахариды GalOMe β , Man, L-Fuc, Glc производства "Рехим" (Москва), реактивы для проведения электрофореза фирмы Serva (Германия). Олигосахариды были синтезированы ранее как описано в работах [13–16]. Для выделения лектинов была использована сыворотка крови I (O) и II (A) групп крови от 10–20 здоровых доноров.

Аффинную хроматографию проводили на колонке (1 × 9 см) объемом 6 мл. В качестве сорбентов использовали макропористое стекло, модифицированное поверхностно привитым полиакриламидом [12], к которому ковалентно присоединены дисахариды Le^c ($\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta$) и Hdi ($\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta$) (колонки Le^c -MPC и Hdi -MPC) [17]. Колонку предварительно инкубировали в течение ночи с 5% бычьим сывороточным альбумином в фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7.3, чтобы предотвратить неспецифическую сорбцию белков сыворотки крови. Затем колонку уравновешивали PBS и нанесли 4 мл сыворотки крови, разбавленной в 10 раз PBS, со скоростью 30 мл/ч. Колонку промывали исходным буфером до $A_{280} = 0.02$. Элюцию лектинов проводили в 1.5% NH_4OH в PBS (pH 9) со скоростью 120 мл/ч. Полученные фракции немедленно нейтрализовали 0.1 М H_3PO_4 до pH 7.3, объединяли и концентрировали на мембране UM 10 (Amicon, Ирландия) до 1 мл. Объединенную фракцию разбавляли в 10 раз и подвергали рехроматографии на той же колонке в тех же условиях.

Определение гемагглютинирующей активности. Гемагглютинацию проводили в U-образных планшетах (Costar, США). В лунки, содержащие 2-кратные разведения раствора лектина (с концентрацией 6.9 и 8 мкг/мл соответственно) в PBS (50 мкл), добавляли по 50 мкл 1% суспензии обработанных трипсином и фиксированных глутаровым альдегидом кроличьих эритроцитов [18]. Результат определяли визуально через 1 ч. За титр лектина принимали минимальную концентрацию, при которой еще наблюдается гемагглютинация.

Определение углеводной специфичности лектина. Углеводную специфичность лектинов определяли методом ингибирования гемагглютинирующей активности. В лунки планшета, содержащие последовательные 2-кратные разведения раствора углевода, добавляли по 25 мкл раствора лектина с титром 4 (начальная концентрация СЛ1 и СЛ2 составляла 5 и 8 мкг/мл соответственно) и выдерживали в течение 1 ч при комнатной температуре, затем в каждую лунку добавляли 50 мкл суспензии эритроцитов. Результат определяли визуально через 1 ч. Минимальную концентрацию ингибитора, при которой еще наблюдается реакция гемагглютинации, принимали за значение концентрации ингибирования.

Электрофорез проводили в блоке полиакриламидного геля в градиенте концентрации акриламида 4–30% [19, 20].

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [21].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lis H., Sharon N. // *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine* / Eds I.E. Liener, N. Sharon, I.J. Goldstein. Orlando: Acad. Press, 1986. P. 35–247.

2. Ikeda K., Sannoh T., Kawasaki N., Kawasaki T., Yamashina I. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 7451–7454.
 3. Laursen S.B., Thiel S., Teisner B., Holmskov U., Wang Y., Sim R.B., Jensenius J.C. // *Immunology.* 1994. V. 81. P. 648–654.
 4. Hind Ch.R.K., Collins P.M., Baltz M.L., Pepys M.B. // *Biochem. J.* 1985. V. 225. P. 107–111.
 5. Kawasaki N., Itoh N., Kawasaki T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994. V. 198. P. 597–604.
 6. Kozutsumi Y., Kawasaki T., Yamashina I. // *J. Biochem.* 1981. V. 89. P. 1799–1807.
 7. Mizuno Y., Kozutsumi Y., Kawasaki T., Yamashina I. // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. P. 4247–4252.
 8. Kawasaki N., Kawasaki T., Yamashina I. // *J. Biochem.* 1983. V. 94. P. 937–947.
 9. Colley K.J., Beranek M.C., Baenziger J.U. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 61–68.
 10. Holmskov U., Teisner B., Willis A.C., Reid K.B.M., Jensenius J.C. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 10120–10124.
 11. Hosomi O., Takeya A., Yazawa Sh. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. V. 1157. P. 45–49.
 12. Ivanov A.E., Kozlov L.V., Shojbonov B.B., Zubov V.P., Antonov V.K. // *Biomed. Chromatogr.* 1991. V. 5. P. 90–93.
 13. Землянухина Т.В., Бовин Н.В., Байрамова Н.Э. // Докл. АН СССР, 1988. Т. 299. С. 129–131.
 14. Бовин Н.В., Землянухина Т.В., Хорлин А.Я. // Биос-орган. химия, 1986. Т. 12. С. 533–538.
 15. Бовин Н.В., Хорлин А.Я. // Биоорган. химия, 1987. Т. 13. С. 1405–1408.
 16. Бовин Н.В., Землянухина Т.В., Чагуашвили Ц.Н., Хорлин А.Я. // Химия природ. соединений, 1988. С. 777–785.
 17. Корчагина Е.Ю., Бовин Н.В. // Биоорган. химия, 1992. Т. 18. С. 283–298.
 18. Brossmer R., Wagner M., Fischer E. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 8752–8756.
 19. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
 20. Hoefer Scientific Instruments (San Francisco (Cal), USA), 1988–1989. P. 137–139.
 21. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1978. V. 86. P. 142–146.

Isolation and Characterization of Galactose-Binding Lectins from Human Serum

E. M. Rapoport, L. S. Zhigis¹, E. Yu. Korchagina, T. V. Ovchinnikova, V. P. Zubov, and N. V. Bovin

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

Abstract—Two galactose-binding lectins, SL1 and SL2, were isolated from human serum by two-step affinity chromatography on sorbents with immobilized disaccharides Gal β 1–3GlcNAc β (Le^c) and Fuc α 1–2Gal β (Hdi). The purification degree of the SL1 and SL2 preparations was 4000–6000 times and yields were 6.9 and 4.7 μ g/ml of serum, respectively. Electrophoresis showed that both lectins are oligomers with molecular masses of about 440 kDa, which are composed of ca. 67 kDa subunits. The carbohydrate specificity of the lectins was assayed by hemagglutination inhibition using mono- and oligosaccharides. Both lectins showed specificity for Gal and GalNAc residues but differed in the interactions with oligosaccharides. In particular, SL1 showed maximum affinity for disaccharide Gal β 1–3GalNAc β (in the form of 4-nitrophenyl glycoside), 6'-sialylactose, and disaccharide residues Fuc α 1–3Gal β and Gal α 1–3Gal β , whereas SL2 was specific for GalNAc α residues and its derivatives as well as for disaccharide Hdi.

Key words: human serum, galactose-binding lectins, carbohydrate specificity, affinity chromatography.

¹ To whom correspondence should be addressed.