



УДК 547.962.5 : 577.458.22

© 1992г.

О. Е. Галанина, С. Падманабхан, Е. Ю. Корчагина,
Т. В. Землянухина, В. В. Демин, Н. В. Бовин

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЛЕКТИНА ИЗ

BUTEA FRONDOSA

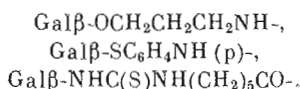
Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва

Из семян *Butea frondosa* при помощи аффинной хроматографии на GalNAc α 1-3Gal-содержащем сорбенте выделены две формы лектина: BFA I и BFA II. Для изучения тонкой углеводной специфичности лектина разработана твердофазная аналитическая система: лектин сорбировали на 96-луночные планшеты из полистирола и измеряли ингибирование его взаимодействия с бiotинметеченным псевдополисахаридом (GalNAc α 1-3Gal-ПАА-биотин). В качестве ингибиторов брали широкий набор моносахаридов, гликозидов, ди- и трисахаридов, их ПАА-конъюгатов, а также природные группоспецифические вещества. Показано, что BFA можно отнести к Gal/GalNAc-специфическим лектинам, причем необходимыми для связывания являются гидроксильные группы при C3 и C4; фрагменты при C2 и C6, а также агликоновая часть не являются определяющими, хотя и могут влиять на связывание. Две формы лектина, BFA I и BFA II, различаются главным образом по олигосахаридной специфичности: BFA I предпочтительно связывается с олигосахаридами Fuc α 1-2Gal и Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc, а BFA II – с Gal β 1-3GlcNAc и GalNAc α 1-3GalNAc. Взаимодействие лектина с иммобилизованными на водорастворимом ПАА углеводами было не более чем на 2 порядка сильнее взаимодействия с соответствующими низкомолекулярными сахарами.

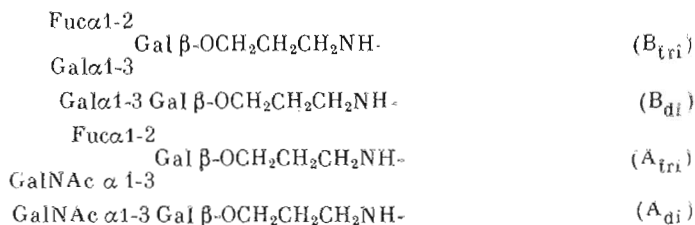
Лектины – углеводсвязывающие белки неиммунной природы [1]. Благодаря их высокой специфичности связывания гликоконъюгатов лектины широко применяются в качестве реагентов, позволяющих различать нормальные и трансформированные клетки, типировать клетки и групповые вещества крови, аффинно выделять и характеризовать структуру углеводсодержащих биополимеров; кроме того, лектины часто применяются в качестве митогенов [2, 3]. Антитела и лектины – два класса углеводсвязывающих белков, существенно различаются по характеру связывания с гликоконъюгатами, что дает основание предполагать для них различный механизм углевод-белкового взаимодействия [4]. Детальное изучение связывания лектинов с синтетическими и природными олигосахаридами показывает, что специфичность на уровне моносахаридов в ряде случаев является первым и достаточно грубым приближением, так как специфичность по отношению к олигосахаридам в ряде случаев выражена сильнее на порядок и более. Типичный пример – конканавалин А, в первом приближении Man-специфический, но проявляющий максимальное сродство к биантенным углеводным N-цепям гликопротеинов [5]. Знание олигосахаридной специфичности значительно расширяет возможности применения лектинов как инструментов для выявления крупных структурных ансамблей (олигосахаридных фрагментов, конформационных «детерминант») в гликоконъюгатах. В данной работе изучена моно- и олигосахаридная специфичность лектина из *Butea frondosa*, известного как Gal-связывающий.

B. frondosa – растение из семейства Leguminosae (бобовых) [6], лектин из его семян обладает гемагглютинирующей активностью [7]. Аффинно выделенный на α -Gal-содержащем сорбенте лектин охарактеризован

как индивидуальный белок, агглютинирующий эритроциты человека групп А, В и О. Гемагглютинация ингибировалась простыми сахарами: *D*-Gal (2,2 мМ), *D*-Gal α -OMe (3,0), лактоза (0,8), GalNAc (21,5), *D*-Fuc (1,5), Aga (*D*- и *L*-, 25) [7], что позволило отнести лектин к Gal-связывающим. Хотя в работе [7] лектин выделяли при помощи аффинного сорбента с α -Gal в качестве специфического лиганда, из приведенных выше данных по ингибированию следовало, что более эффективным может быть сорбент с β -галактозным лигандом. Поэтому для выделения лектина из *B. frondosa* мы испытали сорбенты со следующими лигандами:



Лиганды были присоединены соответственно к макропористому стеклу (2000 Å), сефарозе и солозе*. Однако ни один из сорбентов не связывал лектин в заметной степени (активность элюата проверялась по его способности агглютинировать эритроциты кролика). Так как лектин агглютинировал эритроциты человека групп крови А и В [7], мы попробовали выделять его на сорбентах с групповой специфичностью А и В (матрица — макропористое стекло), а именно на сорбентах со следующими лигандами:



Активно связывал лектин из *B. frondosa* (0,9—1 мг/1 мл сорбента) лишь последний из них, с иммобилизованным А-дисахаридом. Этот сорбент специфически извлекал из экстракта семян *B. frondosa* компонент, агглютинирующий эритроциты кролика и соответствующий описанному лектину [7] по данным электрофореза. Хотя в работе [7] лектин описан как индивидуальный двухсубъединичный белок, нам удалось разделить его на две формы**. Лектин ВFA I элюировался с аффинной колонки 5% раствором галактозы, а ВFA II—5% галактозой в присутствии 0,9% NaCl. После дополнительной очистки с помощью препаративного капиллярного электрофореза анализ N-терминальной последовательности показал индивидуальность полученных белков**. Углеводная специфичность изучалась на препаратах, очищенных при помощи капиллярного электрофореза.

Тест-система. Так как ингибирование гемагглютинации требует большого расхода ингибиторов и дает лишь полуколичественные результаты, мы разработали твердофазную аналитическую систему, основанную на ингибировании взаимодействия лектина (сорбированного на пластике) с водорастворимым конъюгатом A₄₁-ПAA-биотин различными низко- и высокомолекулярными сахарами (см. табл. 1 и 2). Выбор А-дисахарида в качестве связывающего лиганда в данной тест-системе определился его активностью при аффинном выделении лектина. Результат взаимодействия (ингибирования) количественно оценивался при помощи конъюгата авидин—пероксидаза. Тест-система показала высокую воспроизводимость результатов (см. «Экспер. часть»), низкое фоновое значение сигнала и

* Аналог ToyoPearl (ВНИИОЧП, Ленинград).

** Статья с подробным описанием выделения, очистки и структурной характеристики ВFA I и ВFA II готовится к печати в журнале «Biomedical Sciences».

оказалась достаточно чувствительной (сильные ингибиторы могут использоваться в концентрациях порядка 1 мкг/мл). В то же время величины относительной ингибирующей способности моносахаридов, полученные в данной тест-системе и в реакции торможения гемагглютинации [7], практически совпадали.

Специфичность BFA I и BFA II

Так как лектин был первоначально охарактеризован как Gal-связывающий [7], мы в первую очередь изучили влияние на взаимодействие с BFA I и BFA II структурных изменений в *D*-галактопиранозильном цикле (а именно конфигурации атомов углерода C1, C2, C3, C4) и различных заместителей при C1 – C6.

Гидроксилы при C3 и C4. Аллильное производное по гидроксильной группе C3 – OH, а также *D*-гулоза, отличающаяся от *D*-галактозы конфигурацией при атоме углерода C3, полностью теряют способность взаимодействовать с обеими формами лектина. *D*-Глюкоза и *N*-ацетил-*D*-глюкозамин, имеющие противоположную *D*-галактозе конфигурацию при C4, также неактивны. Поэтому можно утверждать, что для связывания обеими формами лектина *B. frondosa* конфигурация при C3 и C4 пиранозного цикла *D*-галактозы является необходимым условием.

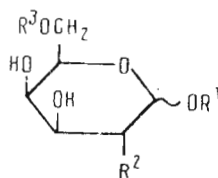
Группа CH₂OH. *L*-Арабиноза, а также арабинозид (*L*-Araβ-OMuf), которые отличаются от *D*-галактозы отсутствием всей гидроксиметильной группы при C5, не взаимодействуют с обеими формами лектина, так же как и *D*-галактуроновая кислота (COOH вместо CH₂OH). Производное галактозы с объемистым трифенилметильным заместителем в положении 6 (6-Tr-CaIβ-OBzl) также неактивно. Однако *D*-фукоза (результат замены гидроксиметильной группы на метильную) равнозначна *D*-галактозе во взаимодействии с BFA I, а по отношению к BFA II заметно (в 5 раз) активнее. По-видимому, сайтом узнавания является только метиленовая группа в CH₂OH, а гидроксильная во взаимодействии с лектином не участвует. Последнее обстоятельство становится существенным при рассмотрении олигосахаридной специфичности лектинов (см. ниже): можно ожидать, что гликозилированная по C6 галактоза способна связываться с лектином, хотя требования к заместителю могут быть достаточно жесткими (судя по тому, что тригильное производное неактивно). Интересно, что BFA II (но не BFA I) заметно взаимодействует не только с *D*, но и с *L*-фукозой, но только в полимерной форме, в виде Fucα-ПАА, что можно интерпретировать как наличие в активном центре лектина сайта узнавания группы CH₂ (или CH₃) со значительным вкладом в общую энергию взаимодействия.

Агликоновая часть: O-, S- и N-алкил- и арилгликозиды D-галактозы и N-ацетил-D-галактозамина. Влияние агликона в простых галактозидах и галактозаминидах на взаимодействие с лектином из *B. frondosa* можно рассматривать с точки зрения как конфигурации гликозидной связи, так и природы агликона. При сравнении активности галактозидов с небольшой агликоновой частью, таких, как Galβ-sp, Galβ-OBzl, Galα-OMe, Galβ-SEt, Galβ-OMe, а также галактозы видно отсутствие влияния конфигурации гликозидной связи на взаимодействие с BFA I и, напротив, заметное влияние на взаимодействие с BFA II. Интересно, что с BFA II оба аномерных метилгалактозида взаимодействуют значительно активнее, чем сама галактоза, что можно объяснить положительным взаимодействием метильной группы с активным центром BFA II. Введение ароматического агликона (нитрофенила, метилумбеллиферила) сказывается на активности значительно сильнее, чем алифатического (см. табл. 1): с одной стороны, GalNAcβ-SNp и Galα-OMuf являются одними из сильнейших мономерных

ингибиторов (см. табл. 1), с другой стороны, β -Muf-производные обоих моносахаридов неактивны вовсе.

Существенно бóльшая активность ароматических гликозидов Gal и GalNAc по сравнению с самими восстанавливающими моносахаридами отмечена для многих растительных лектинов того же семейства бобовых, что и BFA, таких, как DBA, GSI A., WFA, SBA и др. [8]. Для ряда лектинов с известной аминокислотной последовательностью обнаружено совпадение по аминокислотам Leu⁸¹, Val⁸⁹, Phe¹¹¹, Phe¹⁸¹, Phe²¹², которые, как установлено с помощью рентгеноструктурных данных, в случае ConA образуют гидрофобный участок [9], способный взаимодействовать с ароматическим агликоном. Не исключено, что аналогичный гидрофобный кластер определяет второй участок связывания (если первым считать фрагмент C3 — OH, C4 — OH, C6 — H₂) и для лектинов из *B. frondosa*. Второй участок связывания дает основание предполагать у BFA I и BFA II наличие олигосахаридной специфичности, причем разной для форм I и II.

Олигосахаридная специфичность. Данные по связыванию моносахаридов и их производных позволяют предположить следующий обобщенный активный фрагмент олигосахаридной цепи:

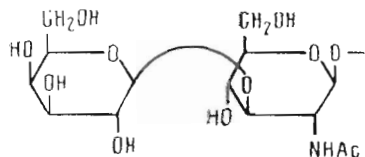


Звено *галакто*-конфигурации может быть терминальным ($R^3 = H$, $R^2 = OH$ или $NHAc$) или внутренним, причем в последнем случае принципиально не запрещены замещения по C6 ($R^3 =$ моно- или олигосахарид) и C2 ($R^2 =$ моно- или олигосахарид); предпочтительную конфигурацию R^2 на основании данных по взаимодействию с моносахаридами и гликозидами предсказать не представляется возможным.

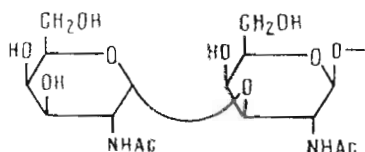
Изучение выбранных по данному принципу олигосахаридов показало значительно бóльшую активность некоторых из них относительно Gal или GalNAc. Так, дисахарид Fuc α 1-2Gal β -sp («базовый» моносахарид Gal замещен по C2) связывался с обеими формами лектина в 60 раз сильнее, чем Gal β -sp (табл. 1), в то время как изомер, Fuc α 1-3Gal β -sp, был совсем неактивен. Производное лактозы, в котором галактозное звено замещено по C6 нейраминовой кислотой, Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc, активнее лактозы. Заметный эффект при наращивании цепи со стороны агликона (R^1) достигается в случае лактозы (сравниваем Gal β 1-4Glc с Gal), а также в случае Λ -дисахарида, GalNAc α 1-3Gal β -sp, аффинность которого в 3 раза выше, чем GalNAc, по отношению к BFA I и BFA II; по сравнению с GalNAc терминальный дисахарид антигена Форссмана, GalNAc α 1-3GalNAc β -sp, заметно хуже взаимодействует с BFA I, но, напротив, значительно (в 7 раз) лучше взаимодействует с BFA II. Однако максимальное увеличение взаимодействия (относительно «родительского» моносахарида) наблюдается для дисахарида Gal β 1-3GlcNAc β -sp, который в 300 раз активнее галактозы, причем столь значительный эффект характерен только для BFA II.

Таким образом, на уровне дисахаридов специфичность BFA I можно определить как Fuc α 1-2Gal, т. е. лектин является H-специфическим; в то же время достаточно активны (табл. 1) лактоза (а также сиаиллактоза) и Λ -дисахарид. BFA II имеет примерно одинаковое сродство к жаровому

дисахариду типа 1 (Le^c) и терминальному дисахариду антигена Форсмана (Fs).



Le^c



Fs

Олигосахаридная специфичность BFA II требует более детального рассмотрения. Структура указанных дисахаридов Le^c и Fs существенно различна, сходными мотивами первичной структуры можно считать лишь участок C3 — C6 невосстанавливающего звена и ацетамидную группу восстанавливающего. Интересно, что «гибридные» дисахариды, имеющие элементы сходства с рассматриваемыми олигосахаридами Le^c и Fs, являются заметно худшими ингибиторами BFA II: Gal β 1-3GalNAc (получается заменой экваториального гидроксила на аксиальный в GlcNAc дисахарида Le^c), Gal α 1-3GalNAc (замена ацетамида невосстанавливающего звена на гидроксил в дисахариде Fs), GalNAc α 1-3Gal (замена ацетамида восстанавливающего звена на гидроксил). Высокую активность дисахаридов Le^c и Fs, но низкую трех «гибридных» дисахаридов можно объяснить либо: а) сходством пространственного расположения критических для связывания с лектином участков, которыми могут быть отмеченные выше фрагмент C3 — C6 невосстанавливающего звена и ацетамидогруппа, б) наличием в лектине нескольких различающихся участков связывания различных олигосахаридов.

Данные по дисахаридной специфичности BFA II вместе с обсуждавшимися ранее данными по гликозидам ароматических агликонов хорошо укладываются в модель двухсайтового (для BFA I, возможно, и трехсайтового) связывания, согласно которой первым (главным) является сайт активного центра, узнающий C3-OH — C4-OH — C6-H₂, а вторым — сайт, узнающий агликоновую часть ароматической или углеводной природы. Для связывания дисахарида Форсмана определяющим несомненно является невосстанавливающий GalNAc, что видно из сравнения концентраций 50% ингибирования галактозаминидов (мМ):

| GalNAc α 1-3GalNAc β (2) | GalNAc | GalNAc α -sp | GalNAc β -sp |
|---------------------------------------|--------|---------------------|--------------------|
| 0,1 | 0,2 | 0,7 | 2,0 |

Напротив, для связывания дисахарида Gal β 1-3GlcNAc β , по-видимому, вторым сайтом узнавания вносит весьма существенный вклад, так как β -галактозиды показывают низкую ингибирующую способность.

Реальную картину связывания BFA II с дисахаридами Le^c и Fs может дать прямое изучение комплексов с использованием методов ЯМР и рентгеноструктурного анализа, однако некоторые предположения можно сделать, основываясь на известных из литературы данных по конформациям

Ингибирование двух форм лектина из *B. frondosa* (BFA I и BFA II) низкомолекулярными сахарами*

| Ингибитор ^{2*} | Концентрация 50%-ного ингибирования (максимальная величина ингибирования, %) | | | | Активность BFA II по отношению к BFA I ^{3*} |
|---|---|-------|----------------------|----------------------|---|
| | BFA I | | BFA II | | |
| | мМ | мг/мл | мМ | мг. мл | |
| Fuc α 1-2Gal β -sp | 0,1 | 0,03 | 0,4 | 0,12 | 1/4 |
| NeuAc α 2-6Lac | 0,4 | 0,24 | 0,8(33) | 0,5(33) ₁ | |
| GalNAc β -SNp | 0,5 | 0,2 | 1,3 | 0,48 | 1/3 |
| H (тип 1)-sp | 0,7 | 0,5 | н. о. ^{4*} | н. о. | |
| H (тип 3)-sp | 0,7 | 0,5 | н. о. | н. о. | |
| Adi | 0,7 | 0,26 | 1,2 | 0,46 | |
| Gal β 1-4Glc | 0,74 | 0,25 | н. о. | н. о. | |
| GalNAc α -sp | 1,3 | 0,5 | 0,7 | 0,26 | |
| Gal β -SNp | 1,5 | 0,5 | 6(42) ₁ | 2(42) | 1/4 |
| Gal α -Muf | 1,6 | 0,5 | 3,3 | 1,1 | 1/2 |
| Gal β 1-4GlcNAc β -sp | 1,7 | 0,9 | 0,9(38) ₁ | 0,5(38) | |
| Gal β 1-3GlcNAc β -sp | 2 | 1 | 0,08 | 0,045 | $\times 25$ |
| GalNAc | 2,3 | 0,5 | 0,2 | 0,05 | $\times 10$ |
| Gal β -ONp | 3 | 0,9 | 1,6 | 0,5 | |
| GalNAc α -Muf | 3 | 1 | 1,4(43) ₁ | 0,5(43) ₁ | |
| Gal β -sp | 6 | 2 | 6(35) ₁ | 2(35) | |
| D-Fuc (6-дезоксид- Gal) | 6 | 1 | 5 | 0,9 | |
| 2-Дезокси-D-Gal | 6 | 1 | | н. п. ^{5*} | |
| Gal β -OBzl | 6 | 1,6 | 7(38) | 2(38) ₁ | |
| Gal | 8 | 1,4 | 25 | 4,5 | 1/3 |
| Gal α -OMe | 9 | 1,8 | 3 | 0,6 | $\times 3$ |
| Gal β -SEt | 9 | 2 | 9 | 2 | |
| Gal β -OMe | 10 | 2 | 10 | 2 | |
| Gal β 1-4 Bzl-6 GlcNAc β -sp | 1,6(43) | 1(43) | | н. п. | |
| Bdi | 3(42) | 1(42) | 3(19) | 1(19) ₁ | |
| Gal β -NHTol | 7(37) ₁ | 2(37) | 4(32) | 1(32) | |
| GalNAc β -sp | 3(33) | 1(33) | 2 | 0,9 | |
| GalNAc α 1-3GalNAc β - sp | 3(34) | 2(34) | 0,1 | 0,06 | |
| Gal β 1-4Glc-ol | | н. п. | 3(33) | 1(33) | |
| Gal β 1-3GalNAc β -sp | | » | 2(30) | 1(30) | |
| Gal α 1-3GalNAc α -sp | | » | 3(28) | 0,5(28) | |
| Afri (тип 1) | | » | 3(25) | 2(25) | |

* Muf — метилумбеллиферил, Lac — лактоза, sp — OCH₂CH₂CH₂NHCOCF₃, Np — 4-нитрофенил, Tol — 4-толуил, Adi — GalNAc α 1-3Gal β -sp, Bdi — Gal α 1-3Gal β -sp, Afri (тип 1) — GalNAc α 1-3Gal β 1-GlcNAc.

^{2*} В порядке уменьшения активности по отношению к BFA I.

^{3*} Отмечено, когда разница более чем двукратная.

^{4*} Н. о. — не определялась, н. п. — не ингибирует.

самых дисахаридов, полученных расчетными и экспериментальными (ЯМР, рентгеноструктурный анализ) методами [10, 11]. Согласно данным работы [10], для дисахарида Форссмана предпочтительны две конформации. В первой отмечается образование водородной связи между карбонильным кислородом ацетамидогруппы восстанавливающего галактозамина (н-GalNAc) и гидроксильной группой при C3 того же моносахарида. Величины диэдральных углов между моносахаридными звеньями (ϕ 63°, ψ -37°, табл. 2) соответствуют конформации, в которой оказываются непосредственно сближенными метилацетамидной группы восстанавливающего звена (н-GalNAc) и CH₂-группа н-GalNAc. Для второй конфор-

Величины диэдральных углов и сближенность гидрофобных сайтов
в дисахаридах Le^c и Fs

| Дисахарид | φ | ψ | Сближенность гидрофобных сайтов |
|-------------------------------------|--------------------|------|---|
| | град | | |
| GalNAcα1-3GalNAcα | (Fs) | | |
| конформер 1 | 63 | -37 | в-NHAc сближен с н-СН ₂ |
| конформер 2 | 79 | -50 | То же |
| Galβ1-3GlcNAcβ (Le ^c) | (Le ^c) | | |
| (как фрагмент трисахарида Н типа 1) | -70 | -110 | в-СН ₂ сближен с н-СН ₂ |

мации отмечается образование водородной связи между ацетамидом н-GalNAc и гидроксильной группой при С4 другого моносахаридного остатка (φ 79°; ψ -50°); в этой конформации ацетамид восстанавливающего GalNAc и СН₂ невозстанавливающего GalNAc также оказываются сближенными.

Конформацию дисахарида Le^c мы взяли из работы [11], где рассматривается трисахарид Fucα1-2Galβ1-3GlcNAc (Н, тип 1), фрагментом которого является дисахарид Le^c, с диэдральными углами φ = -70, ψ = -110°. Данные величины диэдральных углов (табл. 2) соответствуют конформации, в которой С6Н₂-группа глюкозаминового остатка сближена с С6Н₂-группой галактозы. Проведенное нами сравнение молекулярных моделей дисахаридов Le^c и Fs, построенных в соответствии с указанными величинами углов, показывает большое сходство их фрагментов, предположительно связывающихся с ВФА II. Этот фрагмент, по-видимому, построен из полярного кластера («polar gate» по терминологии Лемье [4]) гидроксильных групп при С3 и С4, а также гидрофобного кластера, построенного из сближенных групп н-С6Н₂ и в-СН₂CONH (дисахарид Fs) или н-С6Н₂ и в-С6Н₂ (дисахарид Le^c). Топография рассматриваемого фрагмента в дисахаридах Le^c и Fs очень близка, что может служить объяснением одинакового взаимодействия этих на первый взгляд совершенно различных дисахаридов с лектином ВФА II. Предлагаемая модель лективсвязывающего участка дисахаридов Le^c и Fs полностью соответствует «конструкция» углеводных детерминант, связывающихся с моноклональными антителами и лектинами, предложенной Лемье [4].

Следует отметить, что оптимальными для взаимодействия с ВФА являются дисахаридные структуры, а родственные три- и тетрасахариды менее активны. Так, трисахарид А, GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ-sp, фрагментами которого являются хорошо связывающиеся с обеими формами лектина дисахариды Fucα1-2Gal и GalNAcα1-3Gal, не взаимодействуют с ВФА I и ВФА II. Трисахарид А (тип 1), GalNAcα1-3Galβ1-3GlcNAc, фрагментами которого являются высокоактивные по отношению к ВФА II дисахариды Galβ1-3GlcNAc и GalNAcα1-3Gal, ингибирует этот лектин только на 25% в высокой концентрации, а с ВФА I совсем не взаимодействует. Трисахарид Н (тип 1) в мономерной форме, Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ-sp, проявляет в 7 раз меньшую аффинность по сравнению с собственным терминальным фрагментом, а в составе тетрасахарида Le^b фрагмент Fucα1-2Gal совсем не является ингибитором, и лишь полимерная форма Le^b слабо взаимодействует с ВФА I. Единственное исключение — трисахарид NeuAcα2-6Lac, который проявляет примерно вдвое большую аффинность сравнительно с лактозой по отношению к ВФА I.

Ингибирование двух форм лектина из *B. frondosa* (BFA I и BFA II) полиакриламидными производными сахаридов и природными группоспецифическими веществами *

| Ингибитор ** | Концентрация 50%-ного ингибирования (Максимальная величина ингибирования, %) | | | | Активность BFA II по отношению к BFA I ** |
|-----------------------------------|---|----------|--------|----------|--|
| | BFA I | | BFA II | | |
| | мМ | мг/мл | мМ | мг/мл | |
| H (тип 2)-ПАА | 0,01 | 0,009 | 0,02 | 0,018 | 1/2 |
| Fuc α 1-2Gal β -ПАА | 0,02 | 0,026 | | н. о. | |
| H (тип 3)-ПАА | 0,03 | 0,04 | | » | ×5 |
| Adi-ПАА | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | |
| GalNAc α -ПАА | 0,05 | 0,025 | 0,01 | 0,005 | |
| Gal β -ПАА | 0,07 | 0,03 | 0,1 | 0,06 | |
| Fuc α 1-2Gal α -ПАА | 0,11 | 0,11 | | н. о. | |
| A _{nat} | — | 0,03 | — | 0,02 | |
| B _{sal} | — | 0,15 | — | н. о. 4* | |
| H _{sal} | — | 0,17 | — | н. о. | |
| Le ^b -ПАА | 0,32 | 0,44 | | н. о. | |
| H _{nat} | — | 0,5 (35) | — | 0,03 | |
| B _{nat} | — | 0,5 (25) | — | 0,1 | |
| Fuc α 1-3Gal β -ПАА | 1 (42) | 1 (42) | | н. о. | н. и. 4* |
| Le ^a -ПАА | 1,1 (44) | 1 (44) | | » | |
| L-Fuc α -ПАА | | | 0,4 | 0,2 | |

* ПАА — полиакриламид, BSA — бычий сывороточный альбумин, A_{nat}, B_{nat}, H_{nat} — суммарная фракция гликопротеинов из человеческих эритроцитов групп крови А, В и H, Adi — GalNAc α 1-3Gal β -sp, B_{di} — Gal α 1-3Gal β -sp, A_{tri} (тип 1) — GalNAc α 1-3Gal β 1-3GlcNAc.

** В порядке уменьшения активности по отношению к BFA I.

3* Отмечено, когда разница более чем двукратная.

4* Н. о. — не определялась, н. и. — не ингибирует.

Проверенные в качестве ингибиторов, но оказавшиеся неактивными по отношению к обоим формам лектина из *B. frondosa* вещества: L-Ara, L-Ara β -OMuf, GalN-HCl, D-Gul, D-GalA, D-Tal, L-Fuc α -OMuf, Gal β -OMuf, 3-O-Al-1-Gal β -OBzl, 6-TrGal β -OBzl, GalNAc β -OMuf, Gal β 1-3GalNAc α -sp, Glc α 1-4Glc (мальтоза), Gal α 1-4Gal β 1-4Glc, Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc, (GalNAc)₂Gal β -sp, Le^a-sp, A_{tri}-sp, B_{tri}-sp, GlcNAc β -ПАА, Fuc α 1-ПАА, Gal α 1-3GalNAc α -ПАА.

Полимерные производные сахаридов и природные вещества с групповой специфичностью крови. Так как с природными гликоконъюгатами взаимодействуют лектины практически всегда поливалентно, было интересно сравнить между собой мономерные (табл. 1) и полимерные (табл. 3) формы сахаридов. Как видно из данных таблиц, относительная аффинность к BFA I и BFA II в ряду полимеров сохраняется такой же, как и в ряду мономеров. Концентрации 50% ингибирования лектина полимерами в 25—90 раз ниже (т. е. константы связывания в 25—90 раз выше), чем соответствующих моновалентных сахаридов, т. е. полимерный эффект имеет место, хотя величина его не очень значительна. В качестве примера более ярко выраженного полимерного эффекта можно привести ингибирование агглютинации эритроцитов лектином малярийного плазмодия, которое осуществляется конъюгатом GlcNAc₂₀BSA по сравнению с GlcNAc в 100 000 раз эффективнее [12].

При взаимодействии лектинов с полимерсвязанными углеводами может наблюдаться ярко выраженная зависимость связывания от плотности углеводного лиганда на полимере [13, 14], что выражается в наличии оптимального для взаимодействия количества лигандов на молекулу полимера и, по-видимому, отражает реальную топографию биологического узнавания лектина и природного гликоконъюгата. Чтобы оценить значимость лигандной плотности для лектинов из *B. frondosa*, мы синтезировали

три серии полиакриламидных конъюгатов, с Gal β , GalNAc α и A₄₁. В каждой серии содержание сахара было 5, 10, 15, 20, 25, 30 и 35% (мольн.). Конъюгаты с различным содержанием лиганда во всех трех сериях практически не различались между собой по взаимодействию с лектинами (данные не показаны), что наряду с довольно низким полимерным эффектом (см. выше) говорит о малой чувствительности BFA к эпитопной плотности углеводных лигандов.

Интересно, что даже низкого в данном случае полимерного эффекта может быть достаточно для того, чтобы придать неактивным (в концентрации до 10 мМ) мономерным лигандам способность взаимодействовать с лектином в данной тест-системе. Это относится к трем L-фукозосодержащим соединениям: Fuc α -sp, Fuc α 1-3Gal β -sp и Le^a (см. нижние строки табл. 3).

Результаты взаимодействия лектина с природными группоспецифическими веществами (суммарными гликопротеинами) из эритроцитов и слюны следует интерпретировать с осторожностью, так как эти вещества представляют собой весьма гетерогенную смесь, причем для каждого гликопротеина характерна еще и гетерогенность по углеводным цепям. Тем не менее общие закономерности строения углеводных цепей названных гликопротеинов известны. Приведенные в табл. 3 данные некоторым из них не противоречат. Так, более высокая активность веществ от доноров группы А по сравнению с В и Н отражает большее родство лектинов к синтетическим производным с терминальным GalNAc α . Можно видеть и обратную ситуацию: вещества из слюны имеют коровым участком дисахарид типа 1, Gal β 1-3GlcNAc, а вещества из эритроцитов — типа 2, Gal β 1-4GlcNAc, однако BFA I, предпочитающий дисахарид типа 2, лучше взаимодействует с веществами из слюны, и наоборот. Величины концентраций 50% ингибирования природными группоспецифическими веществами относительно невелики, если сравнивать их с лучшими синтетическими полимерными ингибиторами. Это говорит о перспективности поиска значительно более аффинных, чем группоспецифические, природных рецепторов BFA I и BFA II, а полученная информация о дисахаридной специфичности лектинов может сделать эти поиски целенаправленными.

Экспериментальная часть

Выделение BFA I и BFA II. Семена *B. frondosa* экстрагировали в течение 15 ч 0,9% NaCl, после центрифугирования белок осадил сульфатом аммония (700 г на 1 л раствора), осадок растворили в воде и диализовали. Полученный раствор наносили на сорбент (см. ниже), предварительно промытый 0,9% NaCl, после чего колонку промывали 0,9% NaCl до полного отсутствия белка в элюате (280 нм). Фракция BFA I смывалась 5% раствором галактозы и содержала около 66% всей гемагглютинирующей активности; фракция BFA II (8% гемагглютинирующей активности) смывалась с колонки 5% раствором галактозы, содержащим 0,9% NaCl.

Угледоды. Группоспецифические олигосахариды, их фрагменты и конъюгаты синтезированы нами ранее [15–19]; использовались нейраминозиллактоза с содержанием α 2-6-изомера 85% и моносахариды фирмы Sigma; ароматические гликозиды, N- и S-гликозиды фирмы «Биопроцесс» (Москва); группоспецифические вещества (суммарные гликопротеины эритроцитов человека, доноры групп А, В и Н) фирмы ТТМ (Москва). Группоспецифические вещества из слюны доноров секреторов (Se/Le) групп крови А, В и Н получены 1-минутным прогреванием слюны при 100°С, после чего хранились при –20°С.

Водорастворимые ПАА-конъюгаты [16] представляют собой полиакриламид средней степени полимеризации около 1000, каждое 10-е звено

того (в некоторых случаях каждое 5-е или 3-е) содержит заместитель -спейсированный углевод, $sp = -(\text{CH}_2)_3-$.

Сорбенты, представляющие собой макропористое стекло, диаметр пор 2000 Å, покрытое полиакриламидом с иммобилизованными на нем углеводными лигандами, получены как описано ранее [20].

Биотинилированный конъюгат для тест-системы. Раствор 5 мг (11 мкмоль) $\text{GalNAc}\alpha 1-3\text{Gal}\beta 1-\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ в 0,6 мл DMF прибавляли к раствору 11 мг (55 мкг-экв.) поли(4-нитрофенилакрилата) (фирмы «Био-процесс») в 0,4 мл DMF, затем 20 мкл триэтиламина и 1 мг (2,8 мкмоль) N-биотинилгексаметилендиамина («Биопроект») в 0,1 мл DMF, смесь выдерживали 24 ч при 40°С, затем прибавляли 50 мкл этаноламина и выдерживали еще 24 ч при 20°С, после чего наносили смесь на колонку с сефадексом LH-20 и конъюгат элюировали водным ацетонитрилом (1:1). Контроль фракций рефрактометрический. Выход конъюгата 90%.

Тест-система. В 96-луночные планшеты (Linbro, Flow) вносили по 100 мкл на лунку раствора лектина в карбонатном буфере (0,05 М, pH 9,6). Выдерживали 2 ч при 37°С, затем 16 ч при 4°С; оптимальная концентрация лектина для проведения последующего ингибирования 1 мкг/мл. Планшеты трижды промывали ФСБ (фосфатно-солевой буфер, 0,15 М, pH 7,2), содержащим 0,05% твина-20, затем вносили по 100 мкл на лунку 1% раствора БСА в ФСБ и выдерживали 1 ч при 37°С, после чего вносили биотиновый конъюгат в водном растворе (оптимальная концентрация 10 мкг/мл, по 50 мкл в лунку), выдерживали 2 ч при 37°С, после чего промывали как описано выше. Вносили конъюгат авидин-пероксидаза (Sigma) в разведении 1:1000 и выдерживали 1 ч при 37°С. После стандартной отмывки вносили субстрат пероксидазы - 0,04% о-фенилендиамин и 0,012% H_2O_2 в фосфатно-цитратном буфере (pH 5,0), через 20 мин реакцию останавливали 50% серной кислотой и интенсивность окраски измеряли на фотометре Titertec Multiskan MCC при 492 нм. Ингибирование взаимодействия лектина с полиакриламидным конъюгатом биотина и А-дисахаридов проводили в двух вариантах. По первому варианту сахарид-ингибитор вносили одновременно с биотиновым конъюгатом, по второму сначала вносили сахарид, а биотиновый конъюгат - через 2 ч после стандартной отмывки. Результаты ингибирования при этих двух постановках опыта не различались. Ингибиторы добавляли в двойных разведениях, начиная с концентрации 10 мг/мл (при слабом ингибировании) или 1 мг/мл (при сильном ингибировании). На основании полученных кривых зависимости величины ингибирования от концентрации сахараидов вычислялась концентрация 50%-ного ингибирования (см. табл. 1 и 3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kocourek J., Horejsi V. // *Nature*. 1981. V. 290. № 5803. P. 188.
2. Kocourek J., Horejsi V. // *Lectins: Biology, Biochemistry, and Clinical Biochemistry*. V. 3/Ed. T. C. Bog-Hansen. Berlin, 1983.
3. Sharon N. // *Trends Biochem. Sci.* 1984. V. 9. № 4. P. 198-202.
4. Lemieux R. U. // *Frontiers in Chemistry*. Oxford: Pergamon Press, 1982. P. 3-24.
5. Kasai K.-I., Oda Y., Nishikata M., Ishii S.-I. // *J. Chromatogr.* 1985. V. 376. № 1. P. 33-47.
6. Tomita M., Kurokawa T., Onozaki K., Ichiki N., Osawa T. // *Experientia*. 1972. V. 28. P. 84-85.
7. Horejsi V., Ticha M., Novotny J., Kocourek J. // *Biochim. et biophys. acta*. 1980. V. 623. P. 439-448.
8. Baker D. A., Sugi S., Kabat E. A., Ratcliffe R. M., Hermentin P., Lemieux R. U. // *Biochemistry*. 1983. V. 22. P. 2741-2750.
9. Rouge P., Ristler J.-L. // *Biochem. Systematics and Ecology*. 1980. V. 18. № 1. P. 29-37.
10. Yadav J. S., Luger P. // *Carbohydr. Res.* 1983. V. 119. № 1. P. 57-73.
11. Rao B. N. N., Dua V. K., Allen C. // *Biopolymers*. 1985. V. 24. P. 2207-2229.

12. Jungery M., Weatherall D. J. // *Microbial Lectins and Agglutinins. Properties and Biological Activity*/Ed. D. Mirelman. N. Y., 1986. P. 335-357.
13. Matrosovich M. N., Mochalova L. V., Marinina V. P., Vyramova N. E., Bovin N. V. // *FEBS Lett.* 1990. V. 272. № 1, 2. P. 209-211.
14. Галипина О. Е., Дерюгина Е. И., Лапенков М. И., Носырев А. Е., Корчагина Е. Ю., Землянухина Т. В., Бовин Н. В. // *Биоорган. химия.* 1991. Т. 17. № 3. С. 343-352.
15. Землянухина Т. В., Бовин Н. В., Байрамова Н. Э. // *Докл. АН СССР.* 1988. Т. 299. № 1. С. 129-131.
16. Землянухина Т. В., Бовин Н. В. // *Биоорган. химия.* 1990. Т. 16. № 3. С. 1096-1104.
17. Бовин Н. В., Землянухина Т. В., Хорлин А. Я. // *Биоорган. химия.* 1986. Т. 12. № 4. С. 533-538.
18. Бовин Н. В., Хорлин А. Я. // *Биоорган. химия.* 1985. Т. 11. № 6. С. 826-829.
19. Bovin N. V., Zurabyan S. E., Khorlin A. Ya. // *Carbohydr. Res.* 1983. V. 112. № 1. P. 23-35.
20. Бовин Н. В., Землянухина Т. В., Чагаишвили Ц. Н., Хорлин А. Я. // *Химия природн. соедин.* 1988. № 6. С. 777-785.

Поступила в редакцию
2.VII.1991

O. E. GALANINA, S. PADMANABHAN, E. Yu. KORCHAGINA, T. V. ZEMLYANUKHINA,
V. V. DEMIN, N. V. BOVIN

CARBOHYDRATE SPECIFICITY OF LECTINS FROM *BUTEA FRONDOSA*

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow*

Two lectin forms, BFA I and BFA II, were isolated from *Butea frondosa* seeds by affinity chromatography on a sorbent of the macroporous glass coupled to the disaccharide GalNAc α 1-3Gal. The two lectin forms were similar in molecular weight and isoelectric point. To study the fine aspects of carbohydrate specificity of the lectins, a solid phase analytical system was developed: the lectin was adsorbed on a 96-well microtitre plate of polystyrene and the inhibition of its interaction with the biotinylated pseudopolysaccharide GalNAc α 1-3Gal-PAA-biotin was measured. A wide variety of monosaccharides, glycosides, di- and trisaccharides, their PAA-conjugates and natural blood group substances were used. It is shown that the lectins belong to the Gal/GalNAc specific family. The hydroxyl groups at C3 and C4, as well as C6-methylene group being essential for the lectin binding. The aglycon groups, substituent at C2, and hydroxyl at C6 though not necessary for the sugar-lectin interaction, are shown to influence the binding. The two lectin forms, BFA I and BFA II, differ mainly in the oligosaccharide specificity: form I preferably binds to the oligosaccharides Fuca1-2Gal and Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc, whereas form II to Gal β 1-3GlcNAc and GalNAc α 1-3GalNAc. The interaction of the lectin with carbohydrates immobilized on the water soluble PAA was about 100 times stronger as compared with the corresponding low molecular weight saccharides.