



УДК 577.114.7

© 1993 М. Милькович, Д. Иегли

ПОЧЕМУ *D*-ГАЛАКТУРОНОВАЯ КИСЛОТА НЕ СВЯЗЫВАЕТСЯ  
С АГГЛЮТИНИНОМ ИЗ *Ricinus communis*\*Отделение биологической химии Медицинского центра Милтона С. Херши,  
Пенсильванский университет, Херши

С целью лучшего понимания структурных элементов, вовлекаемых в лектин-углеводное взаимодействие, изучено связывание с агглютинином *Ricinus communis* (RCA I) различных С6-производных галактозы. Показано, что неспособность низких концентраций *D*-галактуроновой кислоты ингибировать гемагглютинацию эритроцитов, вызываемую RCA I, обусловлена внутримолекулярными водородными связями между атомом водорода С4-гидроксильной группы и одним из кислородных атомов С6-карбоксамидной *D*-галактуроновой кислоты, а не отрицательным зарядом и/или стерическими размерами С6-карбоксилата, как предполагалось ранее. Таким образом, однозначно показано, что при связывании *D*-галактозы с RCA I С4-гидроксильная группа служит донором водородной связи. Показано также, что отрицательно заряженный заместитель при С6-атоме галактозы (как в *D*-галактозо-6-сульфате) не ингибирует связывание модифицированной галактозы с RCA I, в то время как положительно заряженная группа, например, как в протонированной 6-амино-6-дезоксид-*D*-галактозе, драматически ингибирует связывание.

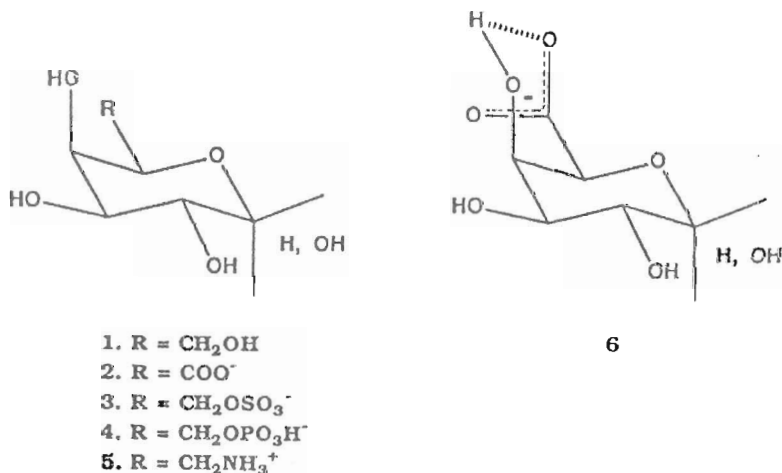
Лектин-углеводное взаимодействие вовлечено в процессы клеточного узнавания и адгезии [1—5]. Известно, что лектины связываются со специфическими сахарными структурами и что ориентация гидроксильных групп пиранозного кольца играет решающую роль в этом процессе. Например, конканавалин А вступает во взаимодействие с *D*-глюкозой и *D*-маннозой, но не связывает *D*-галактозу, в то время как лектин RCA I связывает *D*-галактозу, но не *D*-глюкозу и *D*-маннозу [6].

Было показано, что взаимодействие *D*-галактозы с RCA I, аналогично взаимодействию с другими галактозосвязывающими протеинами [7, 8], экстремально чувствительно к химической модификации С3- и/или С4-углеродных атомов *D*-галактозы и менее чувствительно к модификации С1- и/или С2-углеродных атомов [9]. Химическая модификация С6-положения *D*-галактозы различным образом сказывалась на связывании моносахарида с RCA I [9]. Когда С6-гидроксильная группа *D*-галактозы заменена на водород или фтор, как в *D*-фукозе или 6-дезоксид-6-фтор-*D*-галактозе, соответственно, связывание производных с RCA I практически такое же, как у самой галактозы [9]. Но когда С6-гидроксиметильная группа заменяется на гидроксильную, как в *D*-галактуроновой кислоте, способность RCA I связывать модифицированный моносахарид резко

\* Посвящено памяти профессора Владимира Быстрова.

снижается [9]. Это понижение в связывании *D*-галактурановой кислоты приписывали либо отрицательному заряду карбоксильной группы, либо большему стерическому размеру этой группы по сравнению с *C*<sub>6</sub>-гидроксильной группой [9]. Однако ни то ни другое объяснение не согласуется с более ранними наблюдениями с том, что нейраминил- $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  6')-лактоза связывается значительно лучше с RCA I, чем лактоза или *D*-галактоза [10].

Для того чтобы лучше понять, почему RCA I связывает нейраминил- $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  6')-лактозу столь эффективно в отличие от *D*-галактурановой кислоты, мы проверили, какой эффект оказывают различно заряженные заместители при *C*<sub>6</sub>-углеродном атоме *D*-галактозы на связывание с RCA I.



### Гемагглютинация

Полная гемагглютинация наблюдалась при концентрации RCA I, равной 2,55 мкг/мл (5 проб). Эритроциты (RBC) считались полностью агглютинированными, когда раствор, в котором они были суспендированы, становился прозрачным и не наблюдалось присутствие неагглютинированных RBC. Гемагглютинация при концентрации RCA I 1,27 мкг/мл давала в некоторых пробах прозрачный раствор, а в других — раствор красноватого оттенка, что предполагало неполную агглютинацию. Для того чтобы определить наименьшую концентрацию RCA I, требующуюся для полной агглютинации 2% суспензии RBC, были поставлены 3 дополнительных опыта с использованием разбавлений, промежуточных между этими двумя концентрациями. Во всех пробах концентрация RCA I 1,82 мкг/мл вызывала полную гемагглютинацию, в то время как растворы, содержащие 1,59 и 1,41 мкг/мл RCA I, давали еще неоднозначные результаты.

### Ингибирование гемагглютинации

Во всех пробах для достижения полноты гемагглютинации были использованы растворы RCA I с концентрацией 2,04 мкг/мл. Эритроциты (50 мкл) смешивали с 50 мкл PBS и использовали как положительный контроль. В качестве отрицательного контроля для каждой пробы использовали раствор, представляющий собой смесь 50 мкл RBC, 10 мкл RCA I и 40 мкл PBS. Положительный контроль никогда не показывал гемагглютинации, в то время как отрицательный всегда гемагглютинировал. В качестве внутреннего контроля для каждой пробы использовали также *D*-галактозу и *D*-галактурановую кислоту (2). *D*-Галактоза всегда полностью ингибировала гемагглютинацию при концентрации 5,55 мМ (24 пробы),

в то время как *D*-галактуроновая кислота не проявляла ингибирования даже при 18,85 мМ (20 проб).

Были также поставлены опыты для определения концентрации *D*-галактуронозой кислоты, вызывающей ингибирование гемагглютинации. Для этого анализа был приготовлен раствор *D*-галактуронозой кислоты с концентрацией 100 мг/мл. Было найдено, что ингибирование осуществляется при концентрации 35,35 мМ (2 пробы). Ранее сообщалось, что даже 200 мМ *D*-галактуронозой кислоты не ингибирует гемагглютинацию [9]. Такое большое расхождение между нашими и более ранними результатами, возможно, объясняется тем фактом, что авторы работы [9] использовали 3% суспензию кроличьих эритроцитов, в то время как мы применяли 2% суспензию человеческих эритроцитов типа 0.

Так как нейраминил- $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  6')-лактоза ингибирует гемагглютинацию при более низкой концентрации, чем лактоза или галактоза [10], мы решили выяснить, влияет ли сиаловая кислота на ингибирование. Было найдено, что сиаловая кислота не ингибирует гемагглютинацию вплоть до 12,93 мМ концентрации (2 пробы). Следовательно, повышенное связывание, наблюдаемое для нейраминил- $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  6')-лактозы, не обусловлено присутствием сиаловой кислоты на галактозном остатке.

Имея в виду все эти наблюдения, можно спросить: почему же С6-карбоксильная группа *D*-галактуронозой кислоты вызывает такое резкое понижение в связывании RCA I? Причиной не может быть отрицательный заряд и/или стерический размер С6-карбоксильной группы, как ранее предполагалось [9], так как и отрицательный заряд, и тот же стерический размер присутствуют в нейраминил- $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  6')-лактозе, а сиалиллактоза, как известно, связывается лучше с лектином RCA I [10]. Наиболее предпочтительное объяснение состоит, по-видимому, в том, что один из кислородных атомов С6-карбоксильной группы *D*-галактуронозой кислоты включается во внутримолекулярную водородную связь с водородным атомом аксиального ориентированной С4-гидроксильной группы, образуя шестичленное кольцо (6).

Для того чтобы подтвердить эту гипотезу, мы решили использовать производные *D*-галактозы, которые имеют при С6-углеродном атоме отрицательно заряженную группу, расположенную дальше от С4-гидроксильной группы и поэтому требующую для образования водородной связи замыкания кольца большего, чем шестичленное.

Мы использовали *D*-галактозо-6-сульфат (3) и сравнивали ингибирование им гемагглютинации с ингибированием, вызываемым *D*-галактозой и *D*-галактуронозой кислотой. Есть три причины для выбора галактозо-6-сульфата в качестве модели: 1) не известно, чтобы сульфат, будучи анионом сильной кислоты, образовывал водородные связи; 2) образование водородной связи кислородным атомом из сульфата должно включать замыкание семичленного кольца; 3) сульфатная группа отрицательно заряжена и имеет стерические размеры, большие, чем карбоксильная группа. Поэтому данная модель может ответить на вопрос, являются ли эти детали строения *D*-галактуронозой кислоты ответственными за плохое связывание с лектином RCA I. Наши эксперименты показали, что галактозо-6-сульфат ингибирует гемагглютинацию RBC лектином RCA I при концентрации 2,66 мМ (4 пробы) и, таким образом, опровергает ранее выдвинутое объяснение причины плохого связывания *D*-галактуронозой кислоты с лектином RCA I.

Интересно указать, что галактозо-6-фосфат (4) ингибирует гемагглютинацию при концентрации, приблизительно в 18 раз большей, чем *D*-галактуронозой кислота (657,68 мМ (5 проб)). Это не удивительно, так как известна сильная тенденция фосфат-аниона к образованию внутри- и межмолекулярных связей.

В заключение мы определили способность 6-амино-6-дезоксид-галактозы (5) ингибировать гемагглютинацию, вызываемую RCA I, и обнаружили, что ингибирование не происходит даже при концентрации 22,20 мМ (10 проб). Причиной выбора 6-амино-6-дезоксид-галактозы явилось наличие положительного заряда при ее С6-атоме (6-аминогруппа протонирована при pH 7,2 в значительной степени), что должно помочь ответить на вопрос: почему галактозо-6-сульфат ингибирует гемагглютинацию, вызываемую лектином, лучше, чем *D*-галактоза (см. выше)?

Ингибирование гемагглютинации, вызываемой RCA I, производными галактозы,

имеющими различные заряженные группы при С6-атоме, в значительной степени зависит от природы и знака заряда этой группы. Так, для полного ингибирования гемагглютинации требуется концентрация *D*-галактуронової кислоты, приблизительно в 7 раз большая, 6-амино-6-дезоксид-*D*-галактозы — более чем в 4 раза большая, чем концентрация *D*-галактозы, а для *D*-галактозо-6-фосфата эта величина выше в 120 раз. В противоположность этому *D*-галактозо-6-сульфат ингибировал гемагглютинацию при половинной от *D*-галактозы концентрации.

Кажется, что наиболее предпочтительным объяснением может быть то, что сродство этих производных к RCA I сильно зависит от способности функциональных групп при С6-атоме образовывать водородную связь с аксиально ориентированной С4-гидроксильной группой. Так как известно, что С4-гидроксильная группа важна для связывания *D*-галактозы с RCA I [9], неспособность этой гидроксильной группы служить донором водорода для лектина неизбежно вызывает понижение в их взаимодействии. Как можно видеть из формулы [6], локализация С6-карбоксильной группы в *D*-галактуронової кислоте оптимальна для создания внутримолекулярной водородной связи с С4-гидроксильным водородным атомом с образованием шестичленного кольца. Присутствие электроотрицательного заместителя при С6-атоме, не готового к образованию водородной связи (а именно таковыми являются кислородные атомы сульфатного остатка в *D*-галактозо-6-сульфате), не должно влиять на способность С4-гидроксильной группы образовывать водородную связь с лектином RCA I и, следовательно, ингибировать гемагглютинацию.

Однако как тогда можно объяснить наблюдаемый факт, что *D*-галактозо-6-сульфат ингибирует гемагглютинацию при более низкой концентрации, чем *D*-галактоза? Возможно, что связывание *D*-галактозо-6-сульфата с RCA I облегчается положительно заряженным окружением связывающего центра RCA I. Поддержка для этой гипотезы получена из недавней публикации Рутенбера и Робертуса [12], в которой они описали выявленную с помощью рентгеноструктурного анализа структуру В-цепи рицина и определили аминокислоты, включенные в связывание лактозы. Эти авторы установили, что аминокислота Gln-35 дает раздвоенную водородную связь с С6- и С4-гидроксильными группами *D*-галактозного остатка лактозы. Так как наши эксперименты проводились при pH 7,2; это гарантирует, что аминокислота Gln-35 протонирована, обеспечивая положительно заряженное окружение для связывания сульфат-аниона. Это объяснение далее подтвердилось потерей ингибирования гемагглютинации, вызываемой лектином, при pH 7,2 6-амино-6-дезоксид-*D*-галактозой, аминокислота которой при этих условиях, как можно ожидать, также протонирована.

В заключение следует подчеркнуть, что для связывания *D*-галактозы с RCA I наиболее важна способность ее С4-гидроксильной группы служить донором водородного атома для RCA I. На это указывает потеря ингибирующей способности *D*-галактуронової кислотой, образующей внутримолекулярную водородную связь с вовлечением С4-гидроксильной группы. Нужно указать, что положительный заряд при С6-атоме *D*-галактозы мешает ингибированию гемагглютинации, вызываемой RCA I.

### Экспериментальная часть

Агглютинин *Ricinus communis* (рицин, RCA I), *D*-галактуронової кислота, *D*-галактозо-6-фосфат, *D*-галактозо-6-сульфат и *N*-ацетилнейраминаовая кислота были приобретены у Sigma Chemical Company, *D*-галактоза — у Fisher Scientific Co. 6-Амино-6-дезоксид-*D*-галактоза была синтезирована согласно методике Хардгера и сотр. [11].

*Запасной раствор рицина.* Коммерческий раствор RCA I разбавляли PBS (137 мМ NaCl, 15,4 мМ NaN<sub>3</sub>, 4,29 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2,68 мМ KCl, 1,47 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2) до концентрации 40,75 мкг/мл.

*Запасная суспензия (2%) красных кровяных телец (RBC).* Приблизительно 5 мл человеческой крови группы 0 центрифугировали при 450g и промывали 5

раз PBS в 15-мл полипропиленовой центрифужной пробирке; получали 2 мл уплотненных клеток, которые разбавляли 98 мл PBS.

*Тесты на гемагглютинацию.* С использованием PBS произвели серийные двукратные разведения запасного RCA-раствора. Для того чтобы определить оптимальную концентрацию рицина для использования в ингибиторном анализе, были сделаны также промежуточные разбавления. По 5 мкл раствора рицина помещали в отдельные ячейки плат для гемагглютинации, к нему добавляли 50 мкл 2% запасной суспензии RBC. Платы помещали в роторный шейкер на 20 мин при 900 об./мин, после чего их просматривали при 50-кратном увеличении с использованием стереоскопического микроскопа Nikon SMZ-2B.

*Запасные растворы сахаров* готовили растворением каждого сахара в PBS до концентрации 10,0 мг/мл. pH сахарного раствора доводили до 7,2, используя, когда необходимо, NaOH.

*Тест на ингибирование гемагглютинации.* Запасной раствор рицина вначале разбавляли PBS до рабочей концентрации 20,38 мкг RCA/мл. Растворы сахара в PBS (10 мг/мл) были подвергнуты серийным двукратным разбавлениям. Были сделаны также дополнительные разбавления при концентрациях, половинных между серийными разбавлениями. Отбирали из каждого полученного раствора по 40 мкл и объединяли с 10 мкл раствора рицина. Полученный раствор перемешивали несколько секунд на вихревой мешалке и затем помещали в отдельные ячейки платы для гемагглютинации. В каждую ячейку добавляли 50 мкл запасной суспензии RBC и платы помещали на роторный шейкер при 900 об./мин на 20 мин и просматривали как в тесте на гемагглютинацию.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brandley B. K., Schnaar R. L. // J. Leukoc. Biol. 1986. V. 40. P. 97—111.
2. Quijcho F. A. // Annu. Rev. Biochem. 1986. V. 55. P. 287—315.
3. Drickamer K. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 20. P. 9557—9560.
4. Brandley B. K., Swiedler S. J., Robbins P. W. // Cell. 1990. V. 63. P. 861—863.
5. Gabius H.-J. // Biochim. et biophys. acta. 1991. V. 1071. P. 1—18.
6. Goldstein I. J., Hayes C. E. // Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. 1978. V. 35. P. 127—340.
7. Lee H., Kelm S., Yoshino T., Schauer R. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1988. V. 369. P. 705—714.
8. Rivera-Sagredo A., Solis D., Diaz-Maurino T., Jimenez-Barbero J., Martin-Lomas M. // Eur. J. Biochem. 1991. V. 197. P. 217—228.
9. Bhattacharyya L., Brewer C. F. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 176. P. 207—212.
10. Debray H., Decout D., Strecker G., Spik G., Montreuil J. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 117. P. 41—55.
11. Hardegger E., Zanetti G., Steiner K. // Helv. chim. acta. 1963. V. 46. P. 282—287.
12. Rutember E., Robertus J. D. // Proteins. 1991. V. 10. P. 260—269.

Поступила в редакцию  
4.XII.1992

M. Miljkovic, D. Yeagley

WHY *D*-GALACTURONIC ACID DOES NOT BIND TO *Ricinus communis* AGGLUTININ

*Department of Biological Chemistry, The Milton S. Hershey Medical Center, The Pennsylvania State University, Hershey*

Binding of various C6 galactose derivatives to *Ricinus communis* agglutinin (RCA I) was studied in order to better understand the structural elements involved in lectin-sugar interactions. The inability of *D*-galacturonic acid to inhibit the hemagglutination of red blood cells by RCA I, at low concentrations, is shown to be due to intramolecular hydrogen bonding between the hydrogen atom of the C4 hydroxyl group and one of the oxygen atoms of the carboxylate anion of *D*-galacturonic acid and not to the negative charge and/or the steric size of the C6 carboxylate as previously suggested. Thus it is unequivocally shown that during the binding of *D*-galactose to RCA I, the C4 hydroxyl group of *D*-galactose serves as the hydrogen bond donor. It is also shown that a negatively charged substituent at the C6 atom of *D*-galactose, as in *D*-galactose-6-sulfate, does not inhibit the binding of the modified *D*-galactose molecule to RCA I, whereas a positively charged group, as in protonated 6-amino-6-deoxy-*D*-galactose, dramatically inhibits the binding.