

На правах рукописи

ПРАЙЗЕЛЬ ОКСАНА ЮРЬЕВНА

**ФУКОЛЕКТИН ИКРЫ ОКУНЯ: ОЛИГОСАХАРИДНАЯ
СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗ УГЛЕВОДНЫХ
АНТИГЕНОВ**

Специальность 02.00.10 – Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук



МОСКВА-2003 г.

Работа выполнена на кафедре Химии и технологии тонких органических соединений Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова и в Институте элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН

Научные руководители:

член-корреспондент РАН, профессор Евстигнеева Рима Порфирьевна
доктор химических наук, профессор Ямсков Игорь Александрович

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор Синицин Аркадий
Пантелеймонович
доктор химических наук, профессор Варламов Валерий
Петрович

Ведущая организация Институт биохимии РАН им. Баха

Защита диссертации состоится «6» октября 2003 г. в 15.00 часов на заседании Диссертационного Совета Д 212.120.01 при Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова по адресу: 119571, Москва, пр. Вернадского, 86.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МИТХТ им. М.В. Ломоносова (119831, Москва, М. Пироговская, 1)
Автореферат разослан «5» сентября 2003 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета,
кандидат химических наук,
старший научный сотрудник

/Лютик А.И./

2003-А
13513

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Лектины как цито- и гистохимические реагенты широко используются при изучении структуры гликопротеинов клеточной поверхности. Перспективным направлением является применение меченых лектинов в исследовании стадий трансформации мембранных и секреторных гликоконъюгатов при патологических процессах, в том числе злокачественных. В этом плане наиболее ценными гистохимическими реагентами на углеводные детерминанты являются узкоселективные лектины, специфичные к терминальному углеводу. Особенно редко встречаются углеводсвязывающие белки, специфичные к фукозе. α -L-фукоза является важным компонентом секреторных гликоконъюгатов, а также определяет фенотип многих клеточных популяций человека. Поскольку этот моносахарид входит в состав ряда антигенных детерминант, включая групповые вещества крови, трансформация которых ассоциируется с патологическими преобразованиями в клетке, и канцерозембриональных антигенов, проявляющихся при различных онкологических заболеваниях, то исследование олигосахаридной специфичности новых фуколектинов представляет особый интерес для применения их в патоморфологической диагностике.

Ряд хорошо изученных фуколектинов широко используется в цито- и гистохимических исследованиях. Ими являются препараты семян растений *Ulex europaeus* и *Lotus tetragonolobus*, гриба пецицы оранжевой *Aleuria aurantia* и плазмы морского угря *Anguilla anguilla*. Поиск новых селективных фукозоспецифичных реагентов остается актуальной проблемой.

Одним из доступных источников фуколектинов является икра некоторых видов рыб. В частности, икра окуня содержит фуколектин, олигосахаридная специфичность которого не изучена. Исследование специфичности данного лектина представлялось актуальным, так как это позволило определить перспективы его применения в качестве диагностического и прогностического маркера.

Диссертационная работа выполнена в рамках программ научных исследований Министерства образования РФ, проводимых в Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова на кафедре Химии и технологии тонких органических соединений по теме № 1Б-4-865 «Синтез супрамолекулярных структур на основе порфиринов, липидов и углеводов с целью изучения процессов, протекающих в клетке и создания препаратов для онкологии, генной терапии и других областей медицины», при поддержке грантов РФФИ № 00-03-32872а, «Ведущие научные школы» № 00-15-97866, и

С.Петербург
09 1993 акт 541

научно-технической программы «Научные исследования высшей школы по приоритетным направлениям науки и техники», подпрограмма № 203 «Химия и химические продукты», раздел научно-технической подпрограммы 05 «Биотехнология», проект № 203. 05. 04. 002.

Цель работы

- Установление олигосахаридной специфичности фуколектина икры окуня.
- Получение диагностических реагентов на основе меченых производных лектина икры окуня.
- Применение фуколектина икры окуня в экспресс-анализе углеводных антигенных детерминант нетоксичного гликопротеина яда вьетнамского скорпиона.

Научная новизна работы

Для исследования специфичности лектина икры окуня разработан оригинальный твердофазный метод экспресс-анализа олигосахаридной специфичности фуколектинов с применением наночастиц коллоидного золота. Известно, что конъюгаты наночастиц коллоидного золота с биоспецифическими зондами широко используются в методах твердофазного анализа, однако для исследования специфичности лектинов данный подход не применялся. В настоящей работе отработаны методические приемы для получения новых маркеров наночастиц коллоидного золота на основе гликоконъюгатов, содержащих важные углеводные антигенные детерминанты, что позволило проводить прямую визуализацию продукта взаимодействия с лектином. Получены перспективные биоспецифические зонды на основе фукозосодержащих углеводных опухолевоассоциированных антигенов, которые успешно могут быть применены для экспресс-анализа неизученных фуколектинов.

Применение данного метода позволило определить уникальную углеводную специфичность фуколектина икры окуня, что было подтверждено исследованием биоспецифических реакций лектина известными методами анализа.

В данной работе установлено, что фукозоспецифичный лектин икры окуня является перспективным прогностическим и диагностическим реагентом, дополняющим существующие цито- и гистохимические зонды на основе известных фуколектинов.

Конъюгацией лектина икры окуня с индикаторной меткой получены диагностические реагенты с новой олигосахаридной специфичностью.

Показано успешное применение меченого лектина икры окуня в анализе углеводных антигенных детерминант гликопротеинов.

Практическая значимость

Применение фукозоспецифичных лектинов обеспечивает получение надежной информации о составе и свойствах гликоконъюгатов клеток и тканей, а также об их структурном изменении в соответствии с характером и выраженностью многих патологических процессов. Это позволяет улучшить раннюю диагностику важнейших заболеваний человека, понимание механизмов заболеваний, а в ряде случаев - прогнозирования течения болезни и эффективности ее лечения. Меченые производные фуколектина икры окуня, специфически связывающие Н-детерминанту, присоединенную к углеводной последовательности тип 1 (Fucal-2Gal β 1-3GlcNAc), в том числе в составе групповых веществ крови и дифукозилированных структур, и Le^b-детерминанту (Fucal-2Gal β 1-3[Fucal-4]GlcNAc β), являющуюся биоспецифическим маркером клеток рака толстой кишки являются перспективными цито- и гистохимическими реагентами для применения их в патоморфологической диагностике.

Апробация работы

Основные результаты работы доложены на конкурсе молодых ученых ИНЭОС РАН им. Несмеянова (2001), на международной конференции молодых ученых «От фундаментальной науки к новым технологиям. Химия и биотехнология биологически активных веществ, пищевых продуктов и добавок. Экологически безопасные технологии». (2001, Москва-Тверь), на XIV зимней международной молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». (2002, Москва), на 20^{-ой} международной конференции «Interlec 20» (2002, Копенгаген), на III съезде биохимического общества (2002, Санкт-Петербург).

Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 112 страницах машинописного текста и состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 157 источников. Работа иллюстрирована 16 рисунками и содержит 1 схему и 17 таблиц.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Предметом исследования в настоящей работе являлся фуколектин икры окуня *Perca fluviatilis*, полученный аффинной хроматографией на иммобилизованном муцине кисты яичника человека группы крови Н(О) фирмой «Лектинотест» (Украина).

При электрофорезе в ПААГ в присутствии β -меркаптоэтанола была обнаружена одна зона с молекулярной массой 13 кДа.

Для изучения углеводной специфичности лектина проводили исследование связывания лектина с конъюгатами, содержащими

олигосахаридные детерминанты, с применением различных методов анализа.

Диссертационная работа включала следующие этапы:

- Синтез конъюгатов на основе олигосахаридов, содержащих антигенные детерминанты
- Получение меченых производных гликоконъюгатов олигосахаридов
- Исследование специфичности лектина икры окуня методом дот-блот анализа
- Исследование специфичности лектина икры окуня методом преципитации высокомолекулярных гликоконъюгатов
- Исследование специфичности лектина икры окуня методом агглютинации наночастиц коллоидного золота, конъюгированных с углеводными лигандами
- Получение диагностических реагентов на основе лектина икры окуня
- Применение меченого лектина икры окуня в анализе углеводных антигенных детерминант неизученного гликопротеина.

1. СТРУКТУРА ГЛИКОКОНЪЮГАТОВ, ИССЛЕДОВАННЫХ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ЛЕКТИНОМ ИКРЫ ОКУНЯ

Для исследования олигосахаридной специфичности лектина икры окуня использовали синтетические и природные гликопротеины. Синтетические гликопротеины, или неогликопротеины получали на основе олигосахаридных детерминант. Поскольку лектин икры окуня был первоначально охарактеризован как фукозоспецифичный, в работе использовали только фукогликоконъюгаты, либо их нефукозилированные предшественники. Три-, тетра-, пента- и гексасахаридные детерминанты были получены в чистом виде из грудного молока человека, которое, в отличие от молока других млекопитающих, является богатым источником сложных фукозосодержащих олигосахаридов. Дисахаридные фуколиганды были получены синтетическим путем.

Очищенные природные гликопротеины: Н-муцин кисты яичника человека и групповые вещества слизистой оболочки свиньи, обогащенные, соответственно А (GalNAc α 1-3[Fuc α 1-2]Gal) и В (Gal α 1-3[Fuc α 1-2]Gal) антигенами, использовали для исследования взаимодействия лектина икры окуня с антигенами групп крови.

Структуры гликоконъюгатов, исследованных на взаимодействие с лектином икры окуня представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Структуры гликоконъюгатов, исследованных на взаимодействие с лектином икры окуня

Структура гликоконъюгата	Обозначение	Антигенная детерминанта
Gal β 1-4Glc - BCA	Lac - BCA	углеводная последовательность тип 6
Fuc α 1-2Gal - BCA	2'-FG - BCA	H-дисахарид
Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc - BCA	2'-FL - BCA	H тип 6-трисахарид
Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc - BCA	LNT - BCA	Le ^c -тетрасахарид
Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc - BCA	LNFP I - BCA	H тип 1-пентасахарид
Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc - BCA	LNFP II - BCA	Le ^a -пентасахарид
Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc - BCA	LNFP III - BCA	Le ^x -пентасахарид
Fuc α 1-2Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc - BCA	LND I - BCA	Le ^b -гексасахарид
Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr - R	BG-H	H-антиген в составе муцина кисты яичника
GalNAc α 1-3[Fuc α 1-2]Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr - R	BG-A	A-антиген в составе муцина слизистой свиньи
Gal α 1-3[Fuc α 1-2]Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr - R	BG-B	B-антиген в составе муцина слизистой свиньи

R – остаток муцина.

Неогликопротеины были синтезированы конъюгацией олигосахаридов с дегликозилированным бычьим сывороточным альбумином (BCA) методом восстановительного аминирования с различной степенью гликозилирования (схема 1). Были получены конъюгаты со степенью гликозилирования 5, 8, 24 и 30 моль олигосахарида на моль белка.

Схема 1



При исследовании связывания лектина с неогликопротеином 2'FL-BCA, содержащим различные количества трисахарида (рис.1.), было

обнаружено, что при гликозилировании 8 моль олигосахарида на моль белка достигается уровень взаимодействия, достаточный для анализа связывания (рис.2).

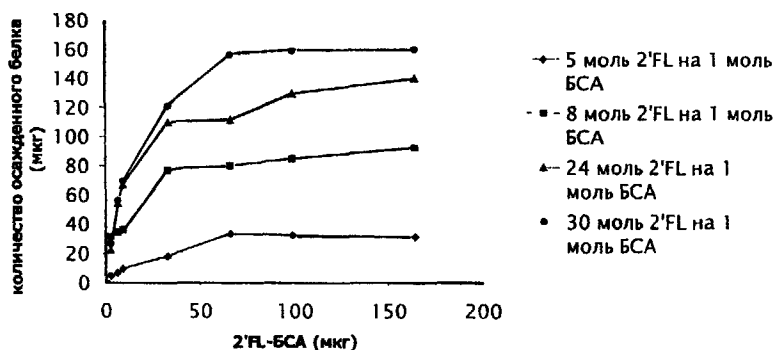


Рис.1. Взаимодействие лектина икры окуня с неогликопротеинами 2'FL-БСА различной степени гликозилирования.

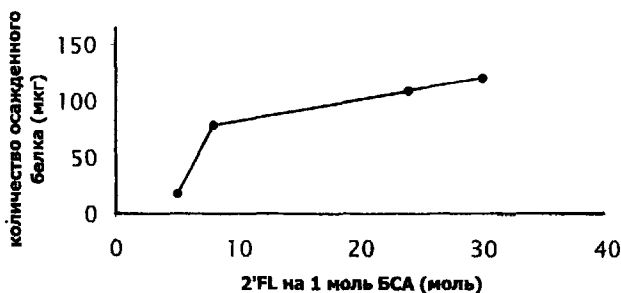


Рис.2. Влияние степени гликозилирования неогликопротеина 2'FL-БСА на связывание лектина икры окуня.

2. ИССЛЕДОВАНИЕ ОЛИГОСАХАРИДНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ЛЕКТИНА ИКРЫ ОКУНЯ МЕТОДОМ ДОТ-БЛОТ АНАЛИЗА С ДЕТЕКЦИЕЙ КОМПЛЕКСАМИ НАНОЧАСТИЦ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА

Чувствительность и воспроизводимость анализа с использованием наночастиц коллоидного золота определяется количеством сорбированного лиганда и pH раствора коллоида. В таблице 2 представлены экспериментально подобранные оптимальные значения количества конъюгированного неогликопротеина и pH раствора коллоида, необходимые для образования стабильного комплекса с частицами коллоидного золота диаметром 17-20 нм.

Таблица 2.
Условия образования стабильного комплекса неогликопротеин - коллоидное золото

Наименование лиганда	pH адсорбции	Количество лиганда (мкг) на 10 мл раствора
БСА гликозилированный	6,5-7,0	600

Анализ специфичности проводили сорбцией лектина на поливинилидендифторидной мембране (ПВДФ) с прокрашиванием мечеными неогликопротеинами. Из полученных данных следует, что лектин взаимодействует с олигосахаридными структурами, содержащими дисахарид Fucal-2Gal (H-антиген).

Существует несколько типов углеводных цепей, несущих H антиген, среди них основными являются углеводные последовательности тип 1 (Gal β 1-3GlcNAc-R), или лакто-N-биоза, тип 2 (Gal β 1-4GlcNAc-R), или N-ацетиллактозамин, тип 3/4 (Gal β 1-3GalNAc α / β 1-R), а также тип 6 (Gal β 1-4Glc-R). Лектин икры окуня проявлял наиболее сильное взаимодействие с пентасахаридом LNFP I (H тип 1- антиген). В гексасахариде LND I (Le^b - антиген) появление второй фукозы при GlcNAc лакто-N-биозы I уменьшало связывание в несколько раз по сравнению с LNFP I. Лектин не взаимодействовал с нефукозилированными олигосахаридами - лактозой и тетрасахаридом LNT (Le^c - антиген), а также с Le^a- и Le^x-антигенами, содержащими Fucal-4 и Fucal-3, соответственно. Данные блоттинга лектина икры окуня были обработаны с использованием программы Videodensitometr SorbfilTM (рис. 3).

На основании данных дот-блот анализа было сделано предположение о специфическом распознавании лектином дисахаридной детерминанты Fucal-2Gal (H-антиген). Необходимо было изучить возможность взаимодействия лектина окуня с другими Fucal-2Gal содержащими антигенами – A и B.

Интенсивность
окрашивания

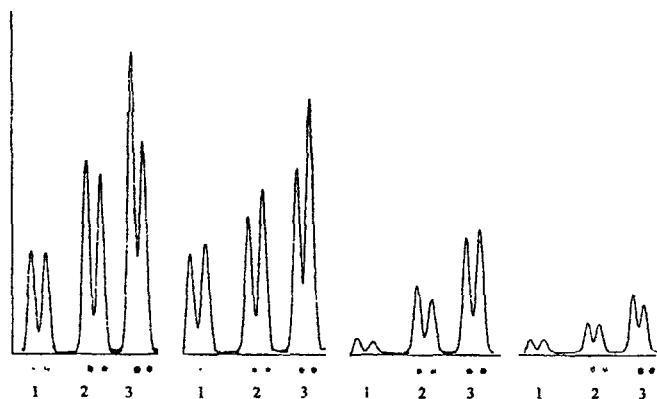


Рис.3. Результаты обработки данных блоттинга лектина икры окуня с использованием программы Videodensitometr SorbfilTM. Окрашивание: а - LNFP I-BCA-Au17, б - 2'-FL-BCA-Au17, в - 2'FG-BCA-Au17, г - LND I-BCA-Au17. Концентрация нанесенного лектина (мкг): 1 - 1, 2 - 5, 3 - 10.

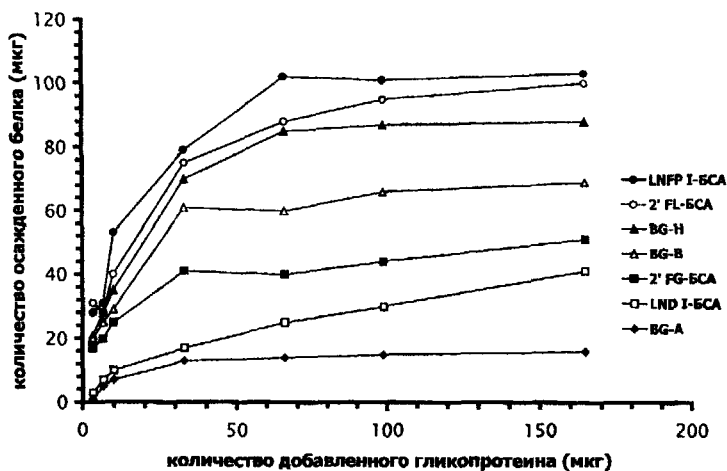


Рис.4. Взаимодействие лектина икры окуня с антигенами групп крови и с неогликопротеинами, содержащими Н-антиген

3. ИССЛЕДОВАНИЕ ОЛИГОСАХАРИДНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ЛЕКТИНА ИКРЫ ОКУНЯ МЕТОДОМ ПРЕЦИПИТАЦИИ

Оценку связывания лектина икры окуня с синтетическими и природными гликопротеинами, содержащими дисахаридную Fuc α 1-2Gal детерминанту проводили методом преципитации, использующим мультивалентность лектина и его способность осаждать высокомолекулярные гликоконъюгаты, определяя зависимость количества осажженного белка от количества добавленного гликопротеина (рис. 4).

Результаты анализа показали, что лектин икры окуня также связывается с А- и В - антигенами, в которых дисахарид Fuc α 1-2Gal экранирован присоединенными моносахаридами. Из антигенов групп крови самое сильное взаимодействие наблюдалось для муцина кисты яичника с групповой специфичностью «Н» (BG-H). Присоединение остатков N-ацетилгалактозамина (BG-A) или галактозы (BG-B) α 1-3 гликозидной связью к Н - антигену уменьшало степень взаимодействия с лектином.

Полученные данные подтвердили, что исследуемый лектин селективно связывает α Fuc1-2Gal эпитоп независимо от несущей последовательности, включая дифукозилированные структуры и антигены групп крови.

4. ИССЛЕДОВАНИЕ ОЛИГОСАХАРИДНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ЛЕКТИНА ИКРЫ ОКУНЯ МЕТОДОМ АГГЛЮТИНАЦИИ КОМПЛЕКСОВ НАНОЧАСТИЦ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА

Изучение взаимодействия лектина икры окуня с олигосахаридами, содержащими Н-дисахаридную детерминанту и с антигенами групп крови проводили методом преципитации природных и синтетических гликопротеинов, сорбированных на наночастицах золотого коллоида, как модели клеток. Условия взаимодействия коллоида с муцином кисты яичника человека и муцинами слизистой оболочки свиньи представлены в таблице 3. Количественное определение связывания осуществляли с помощью спектрофотометрического измерения интенсивности окрашивания раствора с использованием серии растворов с разведением лектина от 10 до 100 мкМ (рис.5).

Таблица 3.

Условия образования стабильных комплексов муцинов с коллоидным золотом.

Наименование лиганда	pH адсорбции	Количество лиганда (мкг) на 10 мл коллоида
Муцин кисты яичника человека	7,5	400
Муцин слизистой оболочки свиньи	6,5	500

Достаточно высокую аффинность лектин проявлял по отношению к 2'FL (H тип 6 – антиген), но самое сильное взаимодействие наблюдалось с пентасахаридом LNFP I (H тип 1 - антиген), в то время как, 2'FG связывалась с лектином гораздо слабее, что свидетельствует о влиянии типа несущей последовательности. Присоединение α GalNAc к H - антигену значительно сильнее влияло на аффинность лектина, чем добавление α Gal.

H-антиген является одним из наиболее важных и распространенных фукоантигенов, экспрессия которого строго контролируется на генетическом уровне и зависит от типа ткани и клеток. Экспрессия H-антигена на секреторных гликоконъюгатах и клетках одних органов необходима для их нормального функционирования, однако увеличение количества Fucal-2Gal эпитопов на других мембранных и секреторных гликоконъюгатах может свидетельствовать о патологическом преобразовании клетки. Так, увеличение экспрессии H - антигена эпителиальными клетками толстой кишки является признаком начальных стадий раковой трансформации. Поэтому для ранней диагностики ряда заболеваний могут быть полезны реагенты, селективно распознающие Fucal-2Gal детерминанту.

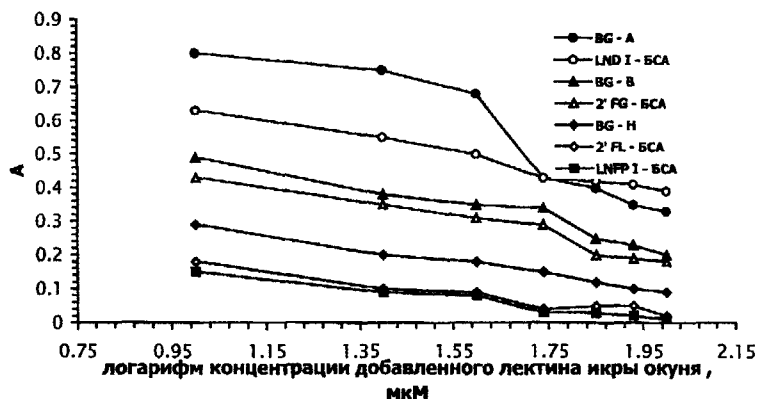


Рис.5. Изменение оптического поглощения при агглютинации комплексов гликоконъюгат-наночастицы коллоидного золота лектином икры окуня.

На основании литературных данных был проведен сравнительный анализ олигосахаридной специфичности фуколектина икры окуня с олигосахаридной специфичностью известных анти-Н лектинов. Практически все изученные анти-Н лектины обладают специфичностью на углеводный фрагмент Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc/Glc-R, т.е. на Н тип 2/6 антиген.

Лектин икры окуня, специфически связывая Н тип 1 и Le^b антигены, отличается по своей олигосахаридной специфичности от известных фуколектинов (таблица 4). В отличие от лектина икры окуня, ни один из них не дифференцирует Н тип 1 и Le^b- антигены от Le^a- и Le^x- антигенов, и α 1-2 связанную фукозу независимо от несущей последовательности, в том числе в составе дифукозилированных структур и антигенов групп крови.

В этом плане лектин икры окуня может стать перспективным гистохимическим реагентом для изучения многих морфологических явлений. Было показано, что гликопротеины головного мозга содержат Fuc α 1-2Gal эпитоп, который, является определяющим в функционировании нейронов, включая явление формирования долгосрочной памяти. Кроме того, Н-антиген является предшественником антигенов групп крови А и В. Очевидно, антигены групп крови экспрессируются на секреторных гликополимерах и мембранных гликоконъюгатах различных тканей, и развитие патологического процесса сопровождается изменением их экспрессии, чаще всего снятием галактозы с В – антигена и N-ацетилгалактозамина с А - антигена и трансформации их в Н эпитоп, что наблюдается при злокачественных новообразованиях толстой кишки.

Таблица 4.

Сравнение антигенной специфичности лектина икры окуня и других фуколектинов.

Лектин	Антиген					
	Н тип 1	Н тип 2/6	Le ^a	Le ^x	Le ^b	Le ^y
<i>Perca fluviatilis</i>	++	-/+	-	-	+	н.о.
<i>Ulex europaeus I</i>	-	++	-	-	+/-	++
<i>Lotus tetragonolobus</i>	-	++	-	+	-	++
<i>Anguilla anguilla</i>	++	++	+	-	++	+
<i>Aleuria aurantia</i>	+	++	+	++	++	++
<i>Galactia tenuiflora</i>	+	++	-	+	-	-
<i>Griffonia</i>	-	-	-	-	++	++
<i>siplicifolia IV</i>						

Примечания:

<+++> - сильное взаимодействие

<+> - слабое взаимодействие

<-> - нет взаимодействия

н.о. - не определено

Кроме того, лектин икры окуня проявляет достаточно высокое сродство к Le^b – антигену, являющемуся биоспецифическим маркером клеток рака толстой кишки. Известные анти-Н лектины не дифференцируют Le^b - антиген от Le^x - антигена, считающегося специфическим маркером метастатических клеток печени, и Le^a - антигена, играющего важную роль в связывании ряда патогенных микроорганизмов с эпителиальными клетками человека. В этом плане лектин икры окуня является перспективным диагностическим и прогностическим гистохимическим маркером. Используя данный лектин в наборе с другими селективными фуколектинами можно получать информацию о клеточной поверхности и структуре гликопротеинов в тканях различных органов, а также исследовать стадии трансформации клеточных мембран и секреторных гликоконъюгатов при различных преобразованиях организма, в том числе злокачественных.

5. ПОЛУЧЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ РЕАГЕНТОВ – МЕЧЕНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ЛЕКТИНА ИКРЫ ОКУНЯ

Лектины, обладающие сродством к сложным олигосахаридным структурам, как цито-, гисто- и биохимические реагенты широко используются в изучении структуры гликопротеинов. Разработан ряд методов анализа, основанных на применении лектинов, конъюгированных с индикаторной меткой. Это гистохимические методы, а также другие гетерофазные системы анализа, такие, как метод обнаружения углеводных антигенов на блотах – после электрофоретического разделения и переноса из геля на матрицу типа нитроцеллюлозы или поливинилидендифторидной мембраны.

Перспективным направлением является применение меченых лектинов в исследовании трансформации гликоконъюгатов при патологических процессах. Лектин икры окуня, селективно распознающий Н тип 1 антиген и онкофетальный Le^b - антиген, дифференцируя их от Le^a - и Le^x - антигенов может быть использован в проведении такого рода анализов. Для этой цели нами были изготовлены конъюгаты лектина икры окуня с биотином и с наночастицами коллоидного золота различного диаметра (таблица 5.).

Таблица 5.

Условия образования стабильных комплексов лектина икры окуня с коллоидным золотом

Размер наночастиц коллоидного золота	pH адсорбции	Количество лиганда (мкг) на 10 мл раствора
37 – 40 нм	7,8	44
17 – 20 нм	7,8	500

Таблица 6.

Олигосахаридная специфичность лектинов, использованных для анализа углеводных антигенов белков яда скорпиона.

№	Наименование лектина	Обозначение	Олигосахаридная специфичность
1	лектин окуня	PFL	N-, O-цепи, Нтип1 Fuca1-2Galβ1-3GlcNAc
2	лектин аспарагуса	LTA	N-, O-цепи, Нтип2 Fuca1-2Galβ1-4GlcNAc
3	лектин коры бобовника анагирилистного	LABA	N-, O-цепи, Нтип2 Fuca1-2Galβ1-4GlcNAc
4	конканавалин А	Con A	олигосахаридные и комплексные N-цепи
5	лектин подснежника	GNA	олигосахаридные N-цепи αMan1-2,3,6
6	лектин чечевицы	LL	N-цепи
7	лектин дурмана	DSA	GlcNAcβ1-4GlcNAc N-цепи Galβ1-4GlcNAc
8	агглютинин пшеницы	WGA-I	сиалированные O/N цепи, дегалактозилированные N-цепи, олигомеры хитина, полилактозаминные цепи.
9	агглютинин пшеницы сукцинизированный	suc-WGA-I	блокируется взаимодействием с сиалоолигосахаридами
10	лектин сои	SBA	O-цепи, GalNAcα1-3Galβ
11	лектин арахиса	PNA	O-цепи, Т антиген Galβ1-3GalNAcα1-O-Thr(Ser)
12	агглютинин хлебного дерева	AIA	O-цепи, Т антиген Galβ1-3GalNAcα1-O-Thr(Ser)
13	лектин виноградной улитки	HPL	O-цепи, Т антиген А антиген Fuca1-2[α1-3GalNAc]Galβ1-3/4GlcNAc антиген Форсмана GalNAcα1-3GalNAcβ1-3Galα1-3Galβ1-4GlcNAc
14	лектин купены многоцветковой	PMA	сиалоолигосахариды
15	лектин бузины черной	SNL	N-цепи 2-6 сиалоолигосахариды

Конъюгат лектина с биотином получали методом активированных эфиров. Для выявления локализации биотинилированного лектина используют высокое сродство биотина к гликопротеину яичного белка авидину или его дегликозилированному аналогу стрептавидину ($K=10^{15}$). Взаимодействие со (стрепт)авидиновым конъюгатом типа (стрепт)авидин – флуоресцеин или (стрепт)авидин – пероксидаза обеспечивает достаточно высокую чувствительность определения.

Для получения конъюгата лектина икры окуня с наночастицами коллоидного золота проводили его комплексообразование с частицами коллоида диаметром 17-20 нм и 37-40 нм.

6. ПРИМЕНЕНИЕ МЕЧЕНОГО ЛЕКТИНА ИКРЫ ОКУНЯ ДЛЯ ЭКСПРЕСС – АНАЛИЗА УГЛЕВОДНЫХ АНТИГЕНОВ ГЛИКОПРОТЕИНОВ.

Конъюгат лектина икры окуня в наборе с мечеными лектинами различной олигосахаридной специфичности использовали для исследования углеводных антигенов нового гликопротеина (таблица 6). Объектом исследования являлась высокомолекулярная фракция белков яда вьетнамского скорпиона, не проявляющая острой токсичности на лабораторных мышах.

6.1 Выявление наличия сложных углеводов и гликоконъюгатов в смеси белков яда вьетнамского скорпиона.

Присутствие углеводсодержащей фракции в смеси белков яда скорпиона было обнаружено проявлением на взаимодействие с маннозоспецифичным лектином семян канавалии (Con A) методом дот – блот анализа. Процедуру обнаружения локализации лектина на мембране проводили с помощью пероксидазы хрена. Благодаря поливалентности, Con A может связываться с маннозосодержащими гликопротеинами и затем с пероксидазой, которая вследствие высокого содержания маннозных цепей обладает сродством к лектину. Наблюдалось четкое связывание фракции белков яда скорпиона с лектином канавалии.

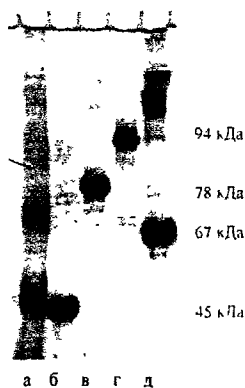


Рис 6. Электрофорез белков яда в ПААГ в присутствии ДДС-Na. Окрашивание Кумасси G 250.

(а) смесь белков яда, 5мкг, (б)овальбумин, (в)овотрансферрин, (г)фосфорилаза, (д)бичий сывороточный альбумин, 5мкг.

Проводили электрофорез смеси белков в пластине ПААГ в денатурирующих условиях в присутствии ДДС-Na. Для прокрашивания белковых зон использовали краситель Кумасси G-250 в хлорной кислоте. Наблюдали наличие двух главных зон с молекулярными массами 48 и 72 кДа (рис.6).

Известно, что применение ДДС-Na-электрофореза для исследования гликопротеинов, особенно при высокой степени гликозилирования, часто сопровождается определенными трудностями. Так, при прокрашивании гликопротеинов на белки, часть полос либо не проявляется, либо получаются размытыми и не

четкими. Поэтому для достоверного проявления белковых полос в геле использовали несколько методик с различными красителями: кумасси, коллоидное серебро, амидо-черный. Присутствие других прокрашиваемых полос при действии коллоидного серебра, является указанием на наличие детектируемых количеств минорных белков в смеси. Кроме того, если при прокрашивании Кумасси G-250 в районе с молекулярными массами 48 кДа и 72 кДа наблюдались одиночные полосы, то при прокрашивании коллоидным серебром и амидо-черным были видны по две рядом расположенные полосы.

Углеводсодержащая фракция в смеси белков яда скорпиона выявляли проявлением диальдегидных групп, образованных после окисления вицинальных диолов и гидроксильных групп углеводов под действием иодной кислоты после электрофоретического разделения смеси. Для выявления диальдегидных групп использовали ШИК – реакцию: реактив Шиффа – иодная кислота. Наблюдалась окрашенная зона в районе 42 кДа, что является экспериментальным указанием на то, что в смеси содержится гликопротеин. ШИК – реакция не является абсолютно достоверным подтверждением присутствия углеводов. В этом плане высокая аффинность и селективность лектинов к углеводам является существенным преимуществом при использовании их в качестве меченых реагентов. Окрашивание полос после разделения белковой смеси с помощью лектинового метода не только является достоверным свидетельством наличия углеводных составляющих но и дает информацию о строении углеводных компонентов биополимеров.

Поэтому для подтверждения наличия гликозилированного биополимера в смеси яда вьетнамского скорпиона мы использовали лектиновый метод анализа.

Исследование белков яда скорпиона проводили с применением набора лектинов различной углеводной специфичности. Из лектинов со специфичностью к N-гликанам использовали лектин семян канавалии мечевидной, специфичный на разветвленные N-гликаны и олигоманнозные цепи, агглютинин завязи пшеницы I, имеющий сродство к сialiрованным N-гликанам, лектин бузины черной, проявляющий высокую аффинность к α 2-6 сialосодержащим N-гликанам. Из лектинов, специфичных к O-гликанам, использовали лектин сои, распознающий концевой моносахарид GalNAc в O-гликанах. Фуколектин икры окуня использовали для выявления наличия H - антигена.

В качестве индикаторной метки предварительно в лектины вводили наночастицы коллоидного золота. Условия сорбции лектинов на наночастицах подбирали экспериментально (таблица 7).

Таблица 7.

Условия образования стабильных комплексов лектинов с наночастицами коллоидного золота диаметром 17 - 20 нм

Лектин	pH адсорбции	Количество лектина (мкг) на 10 мл коллоида.
Con A	8,1	275
WGA I	9	500
SNL	7,5	500
SBA	6,5	500

В качестве матрицы для электрофоретического переноса белков из геля использовали нитроцеллюлозную мембрану. При прокрашивании мембраны лектинами меченными частицами коллоидного золота диаметром 17-20 нм детектировалась одна полоса с молекулярной массой 42 кДа, что подтверждает результаты анализа с ШИК – реакцией. Лектиновый анализ показал наличие как N-, так и O-связанных гликанов. Наблюдалось сильное взаимодействие с лектином канавалии, в то время как связывание с агглютинином завязи пшеницы отсутствовало. Это можно объяснить тем, что лектин канавалии имеет более широкую специфичность. Окрашенная полоса наблюдалась при действии лектина сои, связывающего O-гликаны, содержащие концевой N-ацетилгалактозамин. Гликоконъюгат яда скорпиона проявлял сродство к фуколектину икры окуня, на основании чего можно сделать вывод о наличии Fuc α 1-2Gal детерминанты в углеводных структурах биополимера.

Связывание с сиапоспцифичным лектином бузины черной отсутствовало, что было также подтверждено негатиным анализом на сиапосые кислоты.

6.2. Очистка гликопротеина яда вьетнамского скорпиона методом ВЭЖХ.

Очистка фракции белков яда с целью получения индивидуального гликопротеина производилась методом ВЭЖХ на двух колонках Ultropac TSKG3000SWG. Смесь содержала один мажорный и несколько минорных пиков. Площадь хроматографического пика соответствующего главному компоненту, равнялась 60% от суммы площадей всех пиков. Для дальнейших исследований были отобраны основные пики, лиофилизированы и исследованы на содержание углеводов

методом Дюбуа. Наличие углеводов было обнаружено в главном компоненте смеси с содержанием 10–15 %.

6.3. Определение молекулярной массы гликопротеина яда вьетнамского скорпиона.

Молекулярная масса гликопротеина была определена методами ДДС-Na-электрофореза и гелепроникающей хроматографии. Для определения молекулярной массы гликопротеина яда вьетнамского скорпиона методом ДДС-Na-электрофореза в качестве стандартов использовали модельные гликопротеины с известными молекулярными массами: гликозилированный бычий сывороточный альбумин (67 кДа), альбумин куриного яйца (45 кДа), овомукоид (27 кДа). По результатам ДДС-Na-электрофореза молекулярная масса гликопротеина была оценена как 42 кДа.

Молекулярный вес гликопротеина, также был исследован методом геле-проникающей ВЭЖХ на колонке TSK G3000SW (300x7,5мм), элюцию проводили 100 mM NaH_2PO_4 при pH 7. Для калибровки использовали следующие белки-свидетели: овотрансферрин (78 кДа), бычий сывороточный альбумин (67 кДа), альбумин куриного яйца (45 кДа), карбоангидраза (30 кДа), соевый ингибитор трипсина (20 кДа), миоглобин (17.2 кДа), лизоцим куриный (14.3 кДа).

Результаты полученные с помощью ДДС-Na- электрофореза и гелепроникающей хроматографии, практически совпадают. Выделенный гликопротеин проявлялся в виде одной полосы в геле и одного пика на профиле элюции, что может служить критерием чистоты белка. Молекулярная масса гликопротеина яда вьетнамского скорпиона была оценена как 40 - 42 кДа. Характеристику выделенного гликопротеина целесообразно было дополнить анализом аминокислотного состава. Это, также, может быть полезно для подтверждения наличия в первичной аминокислотной последовательности потенциальных сайтов гликозилирования. Результаты исследования аминокислотного состава представлены в таблице 8.

Из представленных данных видно, что первичная последовательность содержит сайты как для O-, так и для N-гликозилирования.

Таблица 8.

Аминокислотный состав гликопротеина яда вьетнамского скорпиона

аминокислота	% содержание
Asx(D+N)	8.3
Thr	4.7
Ser	12.6
Glx(E+Q)	13.3
Pro	-
Gly	16.2
Ala	8.9
Val	4.5
Met	-
Ile	4.1
Leu	4.9
Tyr	1.8
Phe	2.7
His	4.2
Lys	8.4
Arg	2.6
Trp	2.8

6.4. Экспресс-анализ углеводных детерминант гликопротеина яда вьетнамского скорпиона методом дот-блот анализа с детекцией лектинами мечеными наночастицами коллоидного золота.

Для анализа углеводных антигенных детерминант гликопротеина яда скорпиона были получены комплексы лектинов с коллоидным золотом диаметром 17 – 20 нм (таблица 9). Для анализа углеводных антигенных детерминант гликопротеина яда вьетнамского скорпиона было отобрано 15 лектинов с различной олигосахаридной специфичностью, в том числе фукозоспецифичный лектин икры окуня, проявляющий высокое сродство к Н тип 1 – антигену и фуколектины аспарагуса и бобовника анагирилистного связывающие Н тип 2 – антиген (таблица 6).

Таблица 9.

Условия образования стабильных комплексов лектинов с наночастицами коллоидного золота диаметром 17 - 20 нм

Лектин	pH адсорбции	Количество лектина (мкг) на 10 мл коллойда
PNA	6,2	300
AIA	7	200
LABA	6 - 6,5	130
LL	7 - 7,5	450
GNA	6,8	500
LTA	6,2	600
suc - WGA I	5,6	450
PMA	6,7 - 7,0	700
DSA	8,0	700
HPL	7,0	650

Результаты исследования углеводов гликопротеина яда скорпиона методом дот - блот анализа на поливинилидендифторидной мембране с прокрашиванием комплексами лектин - коллоидное золото показали сильное связывание с лектинами специфически распознающими олигоманнозидные цепи (ConA, LL, GNA), очень слабо гликопротеин взаимодействовал с группой лектинов, имеющих аффинность к N-цепям комплексного типа (WGA I, suc-WGA I, DSA). Достаточно сильное сродство гликопротеин проявлял по отношению к лектинам специфичным к O-гликанам (SBA, PNA, AIA, HPL). Из этой группы лектинов самую высокую аффинность показал лектин виноградной улитки (HPL), который в отличие от лектинов сои, арахиса и хлебного дерева (SBA, PNA, AIA) распознает фукозосодержащий A антиген в O-гликанах. Наряду с этим, с гликопротеином хорошо взаимодействовали фукозоспецифичные лектины - икры окуня, аспарагуса и бобовника анагирилистного, на основании чего можно сделать вывод о наличии фукозилированных олигосахаридов в гликопротеине яда скорпиона.

Таким образом из полученных результатов был сделан вывод, что гликопротеин содержит несиалированные O-гликаны, в т.ч. фукозилированные, и N-гликаны олигоманнозидного типа.

Для очищенного гликопротеина яда скорпиона был проведен анализ углеводного состава, который показал гликозилирование белка - 15%. Из нейтральных моносахаридов были детектированы - манноза, галактоза и фукоза, из заряженных - N-ацетилглюкозамин и N-ацетилгалактозамин.

ВЫВОДЫ

1. Синтезированы конъюгаты наночастиц коллоидного золота на основе фукозосодержащих углеводных опухолевоассоциированных антигенов.
2. Разработан метод экспресс-анализа олигосахаридной специфичности фуколектинов.
3. Установлена уникальная углеводная специфичность фуколектина икры окуня, отличающая его от используемых в диагностике фуколектинов.
4. Получены новые диагностические реагенты на основе фуколектина икры окуня, специфически распознающие онкофетальные H тип 1 и Le^b - антигены, дифференцируя их от Le^x и Le^a - антигенов.
5. Впервые выделен гликопротеин яда вьетнамского скорпиона с молекулярной массой 42 кДа в котором детектированы несиалированные O-гликаны, в т.ч. фукозилированные, и N-гликаны олигоманнозидного типа.

Приношу благодарность всем сотрудникам Лаборатории Физиологически Активных Биополимеров ИНЭС РАН за неоценимую помощь в работе.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Пискарев В.Е., Прайзель О.Ю., Евстигнеева Р.П., Ямсков И.А. Изучение олигосахаридной специфичности фуколектина икры окуня с использованием комплексов неогликопротеин – коллоидное золото.// Прикл. Биохимия и микробиология.- 2003.- Т.39.- № .1.- С. 94-98.
2. Евстигнеева Р.П., Ямсков И.А., Прайзель О.Ю., Пискарев В.Е. Фуколектин икры окуня *Perca fluviatilis* конъюгированный с коллоидным золотом: новый гистохимический реагент.// Доклады Академии Наук.- 2003.- Т. 389.- №. 5.- С. 106-109.
3. Прайзель О.Ю., Пискарев В.Е., Ямсков И.А. Использование комплексов коллоидного золота в гликохимии. Материалы конференции “От фундаментальной науки к новым технологиям. Химия и биотехнология биологически активных веществ, пищевых продуктов и добавок. Экологически безопасные технологии.” Москва-Тверь. 2001. С.26.
4. Piskarev V.E., Preisel O.Yu. Fine Oligosaccharide Specificity of Fucose – specific Perch Oocyte Lectin.The Proceedings of Twentieth International Lectin Meeting (Interlec 20). Ed. I. Bog – Hansen . Copenhagen. 2002. P. 127.
- 5.Прайзель О.Ю., Пискарев В.Е., Ямсков И.А. Использование комплексов коллоидного золота для экспресс – анализа углеводных антигенов гликопротеинов и оценки углеводной специфичности лектинов. XIV Зимняя международная молодежная научная школа “Перспективные направления физико – химической биологии и биотехнологии”. Москва. 2002. С. 82.
6. Прайзель О.Ю., Пискарев В.Е., Ямсков И.А. Выделение нового гликопротеина яда вьетнамского скорпиона *Buthus occitanus* sp. и первичная оценка структуры углеводов методом лектинового анализа. III Съезд биохимического общества. Санкт – Петербург. 2002. С. 510.
7. Oksana Yu. Preisel, Rima P. Evstigneeva, Igor A. Yamskov, and Alexander A. Shtil. Fucose Specific Lectins in Cancer Research and Diagnosis.// International Journal of Oncology.- 2003. in press.
8. Прайзель О.Ю., Евстигнеева Р.П., Ямсков И.А. Применение фукозоспецифичных лектинов в диагностике и изучении новообразований.// Биомедицинская химия.- 2003. в печати.

Подписано в печать 1.08.2003 г. Формат 60х90, 1/16.
Объем 1,5 п.л. Тираж 100 экз. Заказ № 440

Отпечатано в ООО "Фирма Блок"

107140, г. Москва, ул. Русаковская, д.1. т. 264-30-73

www.blok01centre.narod.ru

Изготовление брошюр, авторефератов, переплет диссертаций.

2003-A
13513

№ 13513