

Ein *WGA*-inhibierendes Oligosaccharid aus Blutgruppen-*H*-Substanz †

Hans Tuppy* und Michael Wrann

Institut für Biochemie, Universität Wien, A-1090 Wien, Österreich

(Eingegangen 6. Oktober 1977)

A WGA-Inhibiting Oligosaccharide From Blood Group H Substance

Blood group *H* substance prepared from pig gastric mucosa is a potent inhibitor of the haemagglutinating action of *WGA* (wheat germ agglutinin). From the blood group substance, upon treatment with $\text{NaOH}-\text{NaBH}_4$, a *WGA*-inhibiting oligosaccharide was detached, which was purified by gel filtration and paper chromatography and shown by gas chromatography to contain galactose, *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylgalactosaminitol in a molar ratio of 2:3:1. Enzymatic release of a *N*-acetylglucosamine residue destroyed the *WGA*-inhibitory activity of the oligosaccharide. The importance of terminal *N*-acetylglucosamine residues for the interaction with *WGA* is discussed.

Nach Transformation durch ein Tumovirus werden die Zellen verschiedener *in vitro* kultivierter tierischer Zellstämme durch *WGA* (wheat germ agglutinin, Weizenkeimlingsagglutinin) agglutiniert, während die Zellen ihrer nicht transformierten Elternstämme unter gleichen Bedingungen auf *WGA* nicht ansprechen¹⁻⁴. Durch die Transformation verursachte Veränderungen der Zellmembran werden für die Agglutinierbarkeit durch *WGA*⁵⁻⁷, aber auch für das veränderte soziale Verhalten von Krebszellen verantwortlich gemacht. Darum haben die Spezifität von *WGA* und die chemische Natur der *WGA*-Rezeptoren an der Zelloberfläche großes Interesse gefunden. Der Befund, daß *GlcNAc*, *N,N'*-Diacetylchitobiose ($\text{GlcNAc} \xrightarrow{\beta 1-4} \text{GlcNAc}$) und *N,N',N''*-Triacetylchitotriose ($\text{GlcNAc} \xrightarrow{\beta 1-4} \text{GlcNAc} \xrightarrow{\beta 1-4} \text{GlcNAc}$) in

† Verwendete Abkürzungen: *WGA* = Wheat germ agglutinin, Weizenkeimlingsagglutinin; *BGS-H* = Blutgruppen-*H*-Substanz; *Fuc* = Fucose; *Gal* = Galactose; *GalNAc* = *N*-Acetylgalactosamin; *GalNAc-ol* = *N*-Acetylgalactosaminitol; *GlcNAc* = *N*-Acetylglucosamin; *NeuNAc* = *N*-Acetylneuraminsäure; *HU* = Hämagglutinationseinheit; *TFA* = Trifluoracetyl.

der Art von Haptene die Wirkung des *WGA* auf Zellen inhibieren, deutete auf eine wichtige Rolle von *GlcNAc*-Resten bei der Cytoagglutination hin⁸⁻¹⁰. Von Zelloberflächen konnten verschiedene Substanzen, Glycolipide¹¹ und Glycoproteine¹²⁻²¹, welche die *WGA*-bedingte Zellagglutination hemmen, isoliert werden. Ihre Untersuchung vermittelte keine klare Vorstellung von der chemischen Natur der *WGA*-Rezeptoren. Einige Ergebnisse sprachen dafür, daß *NeuNAc*, die als Monosaccharid keine Inhibition bewirkt, in glykosidisch gebundener Form an der Cytoagglutination beteiligt ist^{8, 19-21}.

Wie in der vorliegenden Arbeit berichtet wird, sind aus der Magenschleimhaut von Schweinen gewonnene wasserlösliche Blutgruppensubstanzen kräftige Inhibitoren der zellagglutinierenden Wirkung des *WGA*. Durch β -Eliminierung wurden von *H*-aktiven Substanzen diejenigen Kohlenhydratketten abgespalten, die mit der Proteinkette O-glykosidisch — über die Bindung *GalNAc*-Serin (oder -Threonin) — verknüpft waren. Aus dem erhaltenen Kohlenhydratgemisch ließ sich durch Reinigung auf Sephadex G-25 und durch Papierchromatographie eine *WGA*-inhibierende Oligosaccharidfraktion isolieren. Ihre qualitative und quantitative Zusammensetzung wurde gaschromatographisch ermittelt, die Abhängigkeit ihrer *WGA*-hemmenden Wirkung von einem terminalen *GlcNAc*-Rest nachgewiesen.

Material und Methoden

WGA wurde aus Wheat Germ Lipase (Sigma Chemical Company, St. Louis) durch Hitzepräzipitation, Ammonsulfatfällung² und durch Affinitätschromatographie auf Ovomuroid-Sepharose gereinigt²².

Agglutinationsbestimmungen erfolgten durch serielle Verdünnung (1:2) von 50 μ l des Agglutinins auf einer Salkplatte und Zusatz von je 50 μ l einer 2% Erythrocytensuspension (in 0,9% NaCl) zu jeder Verdünnung. Eine Hämagglutinationseinheit (*HU*) ist die Menge des Agglutinins, die imstande ist, 50 μ l einer 2% Erythrocytensuspension (Blutgruppe 0) vollständig zu agglutinieren. (Bei *WGA* Agglutinationszeit 3 oder 30 Min., bei gelegentlichem Schütteln der Platte; bei Anti-*H*: 30 Min.)

Agglutinationshemmungen wurden durch serielle Verdünnung von 50 μ l eines Inhibitors auf einer Salkplatte, Zusatz von je 50 μ l Agglutinin (gewöhnlich 2*HU*) zu jeder Verdünnung, Inkubation (*WGA*: 10 Min., 22°, Anti-*H*: 30 Min., 37°) und Zusatz von je 50 μ l 2% Erythrocytensuspension bestimmt.

Bewertung der Agglutination: 4 (vollständige Agglutination), 3, 2, 1, \pm , — (völliges Ausbleiben der Agglutination).

Anti-*A*(human) wurde von den Behringwerken Marburg/Lahn bezogen, Anti-*H* (*Ulex europaea*) wurde von Dr. H. Schenkel-Brunner zur Verfügung gestellt.

Blutgruppen-*H*-Substanz (*BGS-H*) wurde aus frischer, vom Fleischhauer bezogener Magenschleimhaut von Schweinen durch Autolyse, Alkoholfällung, Phenolextraktion und erneute Alkoholfällung gereinigt²³ und war vollkommen frei von *A*-Aktivität. Noch 0,1 μ g *BGS-H* war imstande, die durch 2 *HU* Anti-*H*

verursachte vollständige Agglutination von 50 μ l einer 2% Erythrocytensuspension zu verhindern.

Reinigung der WGA-inhibierenden Oligosaccharidfraktion *Hf* aus BGS-H: β -Elimination: 1,5g BGS-H wurden in 30ml 0,2N-NaOH, die 1% NaBH₄ enthielt, gelöst und bei Raumtemp. unter gelegentlichem Schütteln aufbewahrt. Nach 24 und nach 48 Stdn. wurde je ein weiteres Prozent NaBH₄ zugesetzt. Nach 72 Stdn. wurde die Lösung mit 10N-HCl vorsichtig neutralisiert, auf eine Säule (5 \times 100 cm) Sephadex G-25/H₂O aufgetragen und mit Wasser eluiert. Fraktionen zu 7,5 ml wurden gesammelt und auf WGA-Hämagglutination getestet (Abb. 1). Die Fraktionen 130 bis 140 wurden vereinigt, lyophilisiert, in Wasser

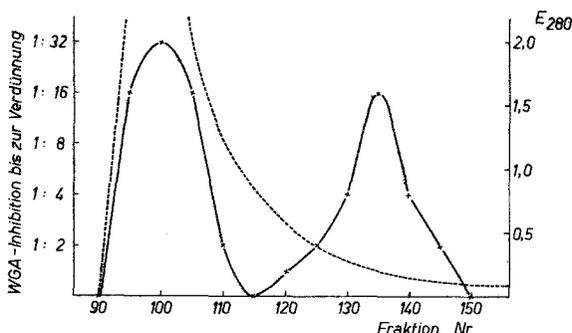


Abb. 1. Gelfiltration des bei der Behandlung von Blutgruppen-H-Substanz mit NaBH₄/NaOH (β -Elimination) erhaltenen Reaktionsgemisches auf einer Sephadex G-25 Säule (5 \times 100 cm). Die Eluatfraktionen (je 7,5 ml) wurden auf Extinktion bei 280 nm (· · · · ·) und Inhibition der WGA-Hämagglutination (x — x) geprüft

gelöst, auf Whatman 3-MM-Papier aufgetragen und mit dem Laufmittel n-Butanol—Pyridin—Wasser (6:4:3) chromatographiert; Laufzeit 48 Stdn. Die WGA-inhibierende Oligosaccharidfraktion *Hf*, die sich auf den Chromatogrammen in einem Bereich von $R_{Lac} = 0,16$ —0,18 befand, wurde mit Wasser eluiert.

Die Neutral- und Aminozucker sowie die aus ihnen durch Reduktion entstehenden Alditole wurden nach 18 Stdn. Methanolyse bei 80° in 1,5N-methanol. HCl gaschromatographisch als O- bzw. N,O-TFA-Derivate bestimmt²⁴.

Reinigung der Glycosidasen von *Trichomonas foetus*: 250 mg lyophilisierte *Trichomonas foetus*-Zellen (zur Verfügung gestellt von Dr. R. Prohaska, Institut für Biochemie, Universität Wien) wurden mit 10 ml 0,02M-Naphosphat, pH 7,0, extrahiert; der Extrakt wurde auf eine Sepharose 6 B-Säule (2,5 \times 110 cm) in 0,02M-Na-phosphat aufgetragen und mit demselben Puffer eluiert. Eluatvolumina von je 5,7 ml wurden gesammelt, mit den entsprechenden p-Nitrophenylglykosiden als Substraten bei pH 7,0 auf α -N-Acetylglucosaminidase-, β -N-Acetylglucosaminidase- und β -Galactosidase-Aktivität geprüft (Abb. 2) und zu den Fraktionen T1, T2, T3, T4, T5 und T6 vereinigt.

Enzymatischer Abbau der Oligosaccharidfraktion *Hf*: Je 100 μg der *WGA*-inhibierenden Oligosaccharidfraktion *Hf* wurden in je 100 μl der Enzymfraktionen *T 1*, *T 2*, *T 3*, *T 4*, *T 5* und *T 6* gelöst und 24 Std. bei 37° inkubiert. Aliquote (10 μl) der Inkubationsgemische wurden mit Mesoinositol als internem Standard versetzt und die abgespaltenen Zucker in Form ihrer *TFA*-Derivate gaschromatographisch nachgewiesen. Weitere Aliquote (50 μl) wurden vor und nach der Inkubation auf *WGA*-Inhibition untersucht. Nur die Fraktion *T 2*

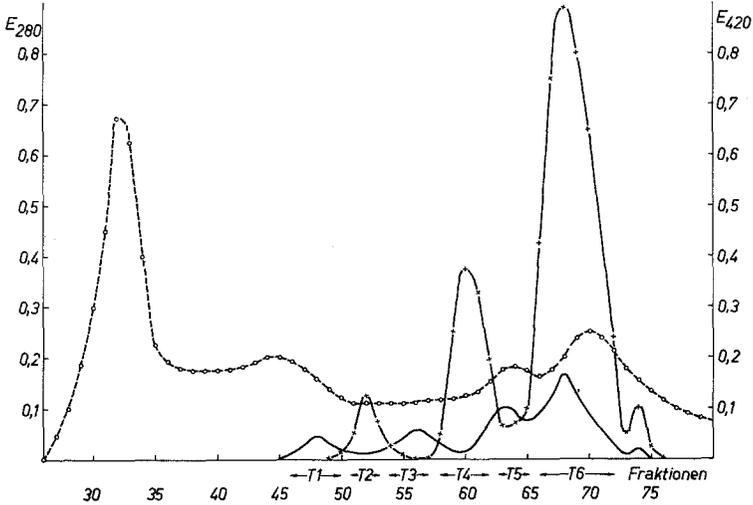


Abb. 2. Gelfiltration der *Trichomonas foetus*-Glycosidasen auf einer Sepharose 6 B-Säule (2,5 \times 110 cm). Die Fraktionen (5,7 ml) wurden auf Extinktion bei 280 nm (o-----o) und wie folgt auf α -N-Acetylglucosaminidase, β -N-Acetylglucosaminidase (\times ——— \times) und auf β -Galactosidase (————) getestet: 50 μl jeder Enzymfraktion wurden mit je 50 μl einer 10 mM-Lösung des entsprechenden p-Nitrophenylglycosides als Substrat bei pH = 7,0 und Raumtemp. inkubiert. Nach 10 Min. wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,0 ml 0,2M-Natriumcarbonat beendet und das freigesetzte p-Nitrophenol bei 420 nm gemessen. α -N-Acetylglucosaminidase war auch nach Verlängerung der Inkubationszeit auf 100 Min. nicht nachzuweisen

verursachte eine Abspaltung von *GlcNAc* (Tab. 2) sowie eine Verminderung der *WGA*-inhibierenden Wirkung von *Hf* (Tab. 1).

β -N-Acetylglucosaminidase von *Aspergillus niger* wurde aus Rhozyme HP-150 (Rohm and Haas, Philadelphia) durch Ammonsulfatfällung, Gelfiltration auf Sephadex G-150²⁵ sowie auf Hydroxyapatit²⁶ gereinigt; das Präparat enthielt 20,4 I. E. des Enzyms/mg Protein und war fast frei von β -Galactosidase und α -Fucosidase (Verunreinigung < 0,1%). Enzymaktivitäten wurden beim jeweiligen pH-Optimum mit den entsprechenden p-Nitrophenylglycosiden als Substraten in 0,01M-Na-Citratpuffer bei 37° bestimmt. 100 μg *WGA*-inhibierende Oligosaccharidfraktion *Hf* wurden mit 0,63 I. E. dieses Enzymprä-

parats 18 Stdn. bei 37° in 0,01*M*-Na-Citrat pH 5,0 inkubiert. Im Inkubationsgemisch konnte jedoch nach der Methode von *Reissig* u. a.²⁷ kein abgespaltenes *GlcNAc* nachgewiesen werden.

Ergebnisse und Diskussion

Wie aus Tab. 1 ersichtlich ist, hemmen blutgruppen-*H*-aktive Glycoproteine, die aus der Magenschleimhaut von Schweinen gewonnen worden sind, die durch *WGA* verursachte Hämagglutination wesentlich stärker als *N,N',N''*-Triacetylchitotriose, die bisher als wirksamster

Tabelle 1. *Inhibition der WGA-Hämagglutination durch Blutgruppen-H-Substanz (BGS-H), N,N'-Diacetylchitobiose (II), N,N',N''-Triacetylchitotriose (III) und die Oligosaccharidfraktion Hf vor (Hf) und nach 24 Stdn. Inkubation bei 37° mit der Enzymfraktion T2 von Trichomonas foetus (Hf-T2). Inhibitorkonzentration jeweils 0,1%*

Verdünnung:	Agglutination													
	nach 3 Min.						nach 30 Min.							
	1:2	1:4	1:8	usw.		1:2	1:4	1:8	usw.		1:2	1:4	1:8	usw.
<i>BGS-H</i>	—	—	—	—	4	4	—	—	—	—	4	4		
II	—	3	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4		
III	—	—	3	4	4	4	1	3	4	4	4	4		
<i>Hf</i>	—	—	—	—	2	4	—	—	1	3	4	4		
<i>Hf-T2</i>	1	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4		

Inhibitor galt und von der mit größter Wahrscheinlichkeit angenommen wurde, daß sie der determinierende Bestandteil der *WGA*-Rezeptoren in Zelloberflächen sei¹⁰. Aus der Blutgruppen-*H*-Substanz ließ sich durch β -Eliminierung mittels NaOH—NaBH₄ eine *WGA*-inhibierende Oligosaccharidfraktion *Hf* abspalten und durch Gel-filtration auf Sephadex G-25 sowie Papierchromatographie reinigen. *Hf* erwies sich ebenfalls als ein stärkerer *WGA*-Inhibitor als Triacetylchitotriose. Es war jedoch bemerkenswert, daß die inhibitorische Wirkung, die von beiden Oligosacchariden auf die Agglutination von Erythrocyten durch *WGA* ausgeübt wurde, bei länger dauernder Beobachtung der Hämagglutination abnahm (Tab. 1); offenbar haben die Oligosaccharide eine kleinere Affinität zu *WGA* als die Glycoproteine und werden daher nach und nach von den Erythrocyten aus ihrer Verbindung mit dem Agglutinin verdrängt.

Hf enthält *Gal*, *GlcNAc* und *GalNAc-ol* in einem molaren Verhältnis von ungefähr 2:3:1; eine geringe Menge von *Fuc* dürfte auf eine Verunreinigung zurückzuführen sein. Im Hydrolysat von *Hf* ließ sich

GalNAc-ol als einziger bei der β -Eliminierung unter reduktiven Bedingungen entstandener Zuckeralkohol nachweisen; dies bestätigt, daß *Hf* über die Bindung *GalNAc*-Hydroxyaminosäure mit der Proteinkette verbunden war*.

Die als *T2* bezeichnete Enzymfraktion, eine von drei bei der Reinigung von *Trichomonas foetus*-Glycosidasen auf Sepharose 6B erhaltenen Fraktionen mit β -N-Acetylglucosaminidase-Aktivität (Abb. 2), war imstande, aus *Hf* *GlcNAc* freizusetzen; da ein Drittel des in *Hf* enthaltenen *GlcNAc* abgespalten werden konnte (Tab. 2), ohne daß dabei entsprechende Mengen anderer Zucker abgelöst wurden, muß sich einer der drei *GlcNAc*-Reste des *Hf* an einem nichtreduzierenden Ende der Kohlenhydratgruppierung befinden.

Tabelle 2. *Gaschromatographische Kohlenhydratanalysen*. A. Kohlenhydratzusammensetzung der *WGA*-inhibierenden Oligosaccharidfraktion *Hf*. B. Aus der Oligosaccharidfraktion *Hf* mit N-Acetylglucosaminidase (Enzymfraktion *T2*) von *Trichomonas foetus* abgespaltene Zucker

<i>Fuc</i>	$\mu\text{mol/l mg Hf}$		
	<i>Gal</i>	<i>GlcNAc</i>	<i>GalNAc-ol</i>
A. 0,25	1,66	2,61	0,81
B. 0,07	0,19	0,85	—

Mit der Abspaltung dieses terminalen *GlcNAc*-Restes verliert *Hf* seine *WGA*-Inhibitoraktivität (Tab. 1). Dieser Nachweis der Wichtigkeit eines endständigen *GlcNAc*-Restes für die Wechselwirkung mit *WGA* stimmt mit dem Befund von *Goldstein* u. a.¹⁰, demzufolge der terminale *GlcNAc*-Rest von Chitin-oligosacchariden für die *WGA*-Inhibition bedeutungslos sei, nicht überein; diese Autoren verwendeten allerdings als Maß für die inhibitorische Aktivität der Oligosaccharide nicht die Hemmung der *WGA*-bedingten Hämagglutination, sondern die der *WGA*-bedingten Präzipitation eines synthetischen Glycoproteins (p-Azophenyl- β -D-*GlcNAc*-Rinderserumalbumin).

Ob der terminale *GlcNAc*-Rest, der für die *WGA*-Inhibition von *Hf*

* Ebenso stark wie die Blutgruppen-*H*-Substanz hemmt auch die aus Schweinemägen isolierte *A*-Substanz die Agglutination von Erythrocyten durch *WGA*. Aus der *A*-Substanz konnte durch β -Eliminierung gleichfalls eine *WGA*-inhibierende Oligosaccharidfraktion gewonnen werden; diese unterschied sich von *Hf* dadurch, daß sie *GalNAc* zusätzlich zu *Gal*, *GlcNAc*, *GalNAc-ol* und *Fuc* enthielt.

erforderlich ist, α - oder β -glycosidisch gebunden ist, läßt sich auf Grund unserer Ergebnisse nicht entscheiden. Obwohl die Enzymfraktion T 2 p-Nitrophenyl- β -D-GlcNAc, nicht jedoch p-Nitrophenyl- α -D-GlcNAc spaltet, könnte sie dennoch eine α -N-Acetylglucosaminidase enthalten; es ist bekannt, daß manche Glykosidasen, so z. B. die α -Fucosidase von *Trichomonas foetus*, einfache p-Nitrophenyl- α -glykosid-Substrate nicht spalten. Eine β -N-Acetylglucosaminidase von *Aspergillus niger*, die imstande ist, Chitin-oligosaccharide zu spalten²⁵, setzte aus *Hf* kein GlcNAc frei; dies deutet darauf hin, daß *Hf* kein terminales GlcNAc in der Bindung $\text{GlcNAc} \xrightarrow{\beta 1 \rightarrow 4} \text{GlcNAc}$ enthält. Die Frage nach der α - oder β -glycosidischen Verknüpfung der für die WGA-Inhibition verantwortlichen terminalen GlcNAc-Reste wurde dadurch besonders aktuell, daß Kochetkov u. a.²⁸ kürzlich — während die vorliegende Untersuchung im Gange war — berichteten, daß in Oligosacchariden, die ebenfalls aus Blutgruppen-H-Substanz gewonnen worden waren, α -glycosidisch gebundene terminale GlcNAc-Reste vorkommen.

Literatur

- ¹ J. C. Aub, C. Tieslau und A. Lankester, Proc. Natl. Acad. Sci. **50**, 613 (1963).
- ² M. M. Burger, Proc. Natl. Acad. Sci. **62**, 994 (1969).
- ³ H. Ben-Bassat, M. Inbar und L. Sachs, Virology **40**, 854 (1970).
- ⁴ M. Inbar und L. Sachs, Proc. Natl. Acad. Sci. **63**, 1418 (1969).
- ⁵ M. M. Burger und K. D. Noonan, Nature [London] **228**, 512 (1970).
- ⁶ W. Eckhart, R. Dulbecco und M. M. Burger, Proc. Natl. Acad. Sci. **68**, 283 (1971).
- ⁷ H. Ben-Bassat, M. Inbar und L. Sachs, J. Membrane Biol. **6**, 183 (1971).
- ⁸ M. M. Burger und A. R. Goldberg, Proc. Natl. Acad. Sci. **57**, 359 (1967).
- ⁹ G. Uhlenbruck, W. Gielen und G. I. Pardoe, Z. Krebsforsch. **74**, 171 (1970).
- ¹⁰ I. J. Goldstein, S. Hammarström und G. Sundblad, Biochim. Biophys. Acta **405**, 53 (1975).
- ¹¹ S. Hakomori, J. Koscielak, K. J. Bloch und R. W. Jeanloz, J. Immun. **98**, 31 (1967).
- ¹² V. K. Jansons und M. M. Burger, Biochim. Biophys. Acta **291**, 127 (1973).
- ¹³ O. K. Langley und E. J. Ambrose, Nature [London] **204**, 53 (1964).
- ¹⁴ J. F. Codrington, B. H. Sandford und R. W. Jeanloz, J. Nat. Cancer Inst. **45**, 637 (1970).
- ¹⁵ C. A. Buck, M. C. Glick und L. Warren, Biochem. **9**, 4567 (1970).
- ¹⁶ E. F. Walborg, jr., R. S. Lantz und V. P. Wray, Cancer Res. **29**, 2034 (1969).
- ¹⁷ D. F. Smith und E. F. Walborg, jr., Cancer Res. **32**, 543 (1972).
- ¹⁸ Y. Akiyama und T. Osawa, Z. Physiol. Chem. **353**, 323 (1972).
- ¹⁹ W. L. Adair und S. Kornfeld, J. Biol. Chem. **249**, 4696 (1974).
- ²⁰ V. P. Wray und E. F. Walborg, jr., Cancer Res. **31**, 2072 (1971).
- ²¹ D. F. Smith, G. Neri und E. F. Walborg, jr., Biochem. **12**, 2111 (1973).
- ²² V. T. Marchesi, in: Methods in Enzymology (V. Ginsburg, Hrsg.). New York-London: Academic Press. 1972.
- ²³ E. A. Kabat, Blood Group Substances. New York: Academic Press. 1956.
- ²⁴ M. Wrann und C. W. Todd, J. Chromat. (im Druck, 1977).

- ²⁵ *O. P. Bahl* und *K. M. Agrawal*, *J. Biol. Chem.* **244**, 2970 (1969).
²⁶ *A. Tiselius*, *S. Hjerten* und *Ö. Levin*, *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 132 (1956).
²⁷ *J. L. Reissig*, *J. L. Strominger* und *L. F. Leloir*, *J. Biol. Chem.* **217**, 959 (1955).
²⁸ *N. K. Kochetkov*, *V. A. Derevitskaya* und *N. P. Arbatsky*, *Eur. J. Biochem.* **67**, 129 (1976).