



УДК 547.963.1 : 543

НОВЫЙ ПОДХОД К РАСЩЕПЛЕНИЮ ЩЕЛОЧЕЛАБИЛЬНЫХ  
О-ГЛИКОЗИДНЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ОСТАТКАМИ  
УГЛЕВОДОВ И ОКСИАМИНОКИСЛОТ

Лебедева З. И., Баратова Л. А., Аваева С. М.,  
Медведева И. В., Мирзянова М. Н., Хорлин А. Я.

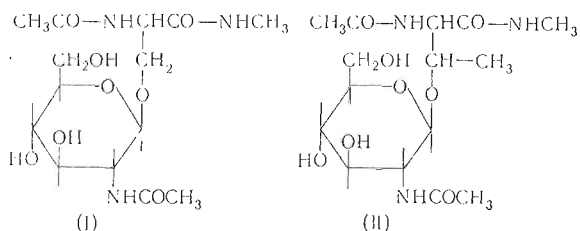
Межфакультетская лаборатория биоорганической химии  
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина  
Академии наук СССР, Москва

На примере метиламидов О-(2-ацетиамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-N-ацетил-D,L-серина и О-(2-ацетиамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-N-ацетил-D,L-треонина разработан метод расщепления О-гликозидных связей между остатками углеводов и оксиаминокислот под действием метиламина и щелочи в присутствии боргидрида натрия, приводящий к устойчивым производным как из аминокислотной, так и из углеводной части молекулы. Их количественный анализ после кислотного гидролиза проводится в одной и той же пробе на аминокислотном анализаторе.

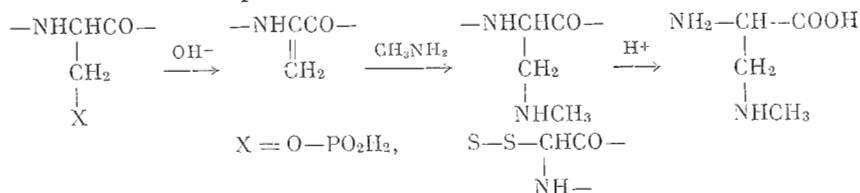
В структурной химии гликопротеинов для избирательного расщепления щелочеллабильных О-гликозидных связей между углеводными остатками и остатками серина и треонина широко используется щелочное β-элиминирование гликозилокислых остатков в присутствии или отсутствие боргидридов [1—10]. Однако существующие методы обнаруживают серьезные недостатки при попытке использовать их для одновременного установления как числа углеводных остатков, так и для локализации их на полипептидной цепи.

С целью поиска новых методов селективного расщепления щелочеллабильных углеводов — белковых связей, удовлетворяющих отмеченным требованиям, нами изучена деградация метиламидов О-(2-ацетиамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-N-ацетил-D,L-серина (I) и О-(2-ацетиамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-N-ацетил-D,L-треонина (II) при обработке щелочным метиламином в присутствии и отсутствие боргидрида натрия.



Гликозиды (I) и (II) были выбраны нами как соединения, моделирующие фрагменты пептидной цепи, связанной O-гликозидной связью с углеводной цепью в гликопротеинах.

Ранее было установлено, что в белках остатки фосфосерина и цистина под действием щелочного раствора метиламина подвергаются реакции  $\beta$ -элиминирования, с последующим присоединением метиламина по двойной связи [11]. Образующаяся аминокислота устойчива в условиях гидролиза и для ее количественного определения предложено использование аминокислотного анализатора [12].



Казалось логичным предположить, что и гликозидные производные серина и треонина будут вести себя подобным образом.

Соединение (I) обрабатывали 1 М метиламином и 0,25 М щелочью. За ходом реакции следили, отбирая через определенные промежутки времени пробы и анализируя их после кислотного гидролиза на содержание серина, N<sup>β</sup>-метилдiamiнопропионовой кислоты и глюкозамина. Полученные данные представлены на рис. 1, из которого видно, что реакция образования N<sup>β</sup>-метилдiamiнопропионовой кислоты заканчивается через 6 ч и к

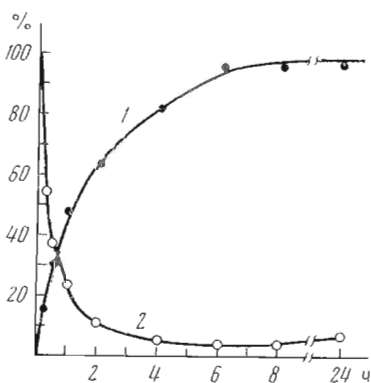


Рис. 1. Взаимодействие соединения (I) с метиламином и щелочью; изменение во времени выхода N-метилдiamiнопропионовой кислоты (1) и серина (2)

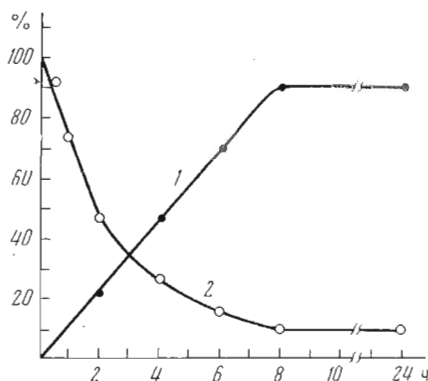


Рис. 2. Взаимодействие соединения (II) с метиламином и щелочью; изменение во времени выхода N-метилдiamiноаспартичной кислоты (1) и треонина (2)

этому времени из 1 моль исходного вещества образуется 0,96 моль дiamiнопропионовой кислоты. Однако скорость образования дiamiнопропионовой кислоты меньше скорости исчезновения исходного соединения, о количестве которого в каждый момент времени можно судить по результатам анализа на серин. Этот факт свидетельствует о том, что реакция  $\beta$ -элиминирования идет быстрее, чем присоединение метиламина по двойной связи.

Реакцию соединения (II) с метиламином и щелочью проводили так же, как описано выше для соединения (I). Результаты этих опытов представлены на рис. 2. Превращение производного треонина в N<sup>β</sup>-метилдiamiноаспартичную кислоту происходит несколько медленнее и заканчивается через 8 ч. И в этом случае скорость реакции  $\beta$ -элиминирования выше скорости присоединения метиламина. Необходимо отметить, что N<sup>β</sup>-метилдiamiно-

масляная кислота обнаруживается при анализе в виде двух пиков, соответствующих, по-видимому, *эритро*- и *трео*-изомерам.

Исследование смеси на содержание глюкозамина показало значительное его разрушение, которое происходит как в процессе реакции, так и при последующем кислотном гидролизе. Так, после 6 ч реакции в реакционной смеси обнаруживается 0,4 моль глюкозамина на 1 моль исходного вещества.

Таким образом, с помощью модельных соединений было показано, что реакция с метиламином и щелочью может быть использована для обнаружения O-гликозидной связи в белках. Первые данные о применении этой реакции к белкам были получены на примере неорганической пирофосфатазы из дрожжей [13].

Следующим этапом работы явилось исследование возможности сохранения углеводной части молекулы в процессе реакции. Известно, что щелочная дегградация углеводов предупреждается восстановлением их боргидридами металлов [6, 7, 14, 15]. В связи с этим возникла необходимость изучить расщепление соединений (I) и (II) при одновременном действии метиламина, щелочи и боргидрида. Важно было установить не мешает ли метиламин восстановлению отщепляющегося сахара боргидридом. С другой стороны, необходимо было выяснить, как влияет присутствие боргидрида на присоединение метиламина к производным непредельных аминокислот — продуктам β-элиминирования, в частности, имеет ли в этих условиях место конкурентная реакция восстановления их боргидридом.

В специальном опыте было показано, что присутствие метиламина практически не влияет на восстановление N-ацетилглюкозамина, о чем свиде-

Состав реакционной смеси после обработки гликозидов (I) и (II) щелочным раствором метиламина в присутствии боргидрида натрия

Номер опыта	Исходное соединение	Условия реакции			Выход, %		
		M NaOH	°C	ч	диаминокислота	глюкозаминит	серин (треонин)
1	(I)	0,25	37	6	89,5	92,0	3,3
2		0,25	22	24	82,2	76,5	3,5
3		0,05	22	24	72,5	64,0	28,2
4	(II)	0,25	37	8	90,0	91,5	10,5
5		0,25	22	24	77,5	75,3	3,8
6		0,05	22	24	22,8	24,4	66,4

тельствуется высокий выход 2-ацетамидо-2-дезоксорбита (см. «Экспериментальную часть»). Далее оказалось, что обработка гликозидов (I) и (II) одновременно 1 M метиламином, 0,25 M щелочью и 0,3 M боргидридом натрия дает высокий выход производных диаминокислот (см. таблицу, опыты 1 и 4). В этом случае отщепляющийся N-ацетилглюкозамин восстанавливается до соответствующего полиола, который после кислотного гидролиза обнаруживается в виде глюкозаминита с помощью аминокислотного анализатора с выходом более 90%. Существенно, что наблюдается соответствие между количествами образующихся продуктов: аминокислота и производных диаминокислот. Необходимо отметить, что ни аланин, ни аминокислотная кислота не были обнаружены в кислотных гидролизатах; это указывает на отсутствие конкурентной реакции восстановления непредельных производных аминокислот боргидридом натрия.

Результаты, приведенные в таблице, указывают на возможность варьирования условий реакции, что может оказаться полезным при структурном анализе гликопротеинов. Так, снижение температуры (опыты 2 и 5) влияет на скорость реакции, но через 24 ч выход диаминокислот и аминокислота достигает 85 и 75%.

Уменьшение щелочности среды (опыты 3 и 6) в большей степени сказывается на реакционной способности соединения (II), чем соединения (I).

Малый выход продуктов модификации в случае гликозилтреонина свидетельствует о резком уменьшении скорости  $\beta$ -элиминирования. Не исключено, что подобное различие в поведении гликозидных производных серина и треонина может быть положено в основу их отдельного определения.

Очень удобным методом для количественной оценки глюкозаминита является использование автоматического анализатора аминокислот в режиме работы, разработанном для определения  $N^{\beta}$ -метилдиаминокислот [12]. В этих условиях глюкозаминит хорошо отделяется от глюкозамина и от остальных компонентов реакционной смеси. Поскольку эти углеводные производные выходят с колонки анализатора вскоре после начала элюции (сразу после суммы кислых и нейтральных аминокислот и до выхода всех основных аминокислот) пики получают острыми и симметричными, что облегчает их обсчет и повышает точность используемого метода.

Таким образом, было показано, что реакцию с метиламином и щелочью можно проводить в присутствии боргидрида натрия, что позволяет обнаруживать O-гликозидные связи при сохранении углеводной части молекулы.

Предлагаемый метод расщепления щелочелabileй O-гликозидной связи имеет ряд существенных преимуществ по сравнению с методами, описанными ранее.

Действительно, для оценки числа углеводных остатков, связанных с остатками оксиаминокислот, наиболее распространенным методом является щелочная обработка гликопротеинов в присутствии боргидрида. При этом образующиеся в результате  $\beta$ -элиминирования непредельные аминокислоты восстанавливаются до аланина или  $\alpha$ -аминомасляной кислоты, а моносахаридные остатки — до соответствующих полиолов. По увеличению в гидролизате аланина судят о числе углеводных цепей, связанных с серином. Как правило, гликопротеины содержат значительное количество аланина, что снижает точность определения числа углеводных цепей, связанных с серином. Кроме того, необходимо отметить, что восстановление  $\alpha$ -аминокротоновой кислоты до  $\alpha$ -аминомасляной протекает с трудом [10], что не дает возможности с достаточной точностью судить о числе углеводных цепей, связанных с остатками треонина.

Описано щелочное  $\beta$ -элиминирование гликозилоксильных остатков в присутствии сульфит-иона, которое приводит к образованию цистеиновой и 2-амино-3-сульфонил-масляной кислот [3, 8]. Однако эти сульфоаминокислоты нельзя идентифицировать с помощью аминокислотного анализатора, так как они не отделяются друг от друга в условиях проведения анализа. Для идентификации и количественной характеристики этих аминокислот предложено использование ТЖХ, которая осуществляется только после отделения цистеиновой и 2-амино-3-сульфонилмасляной кислот от всех других аминокислот, присутствующих в белковом гидролизате. Введение дополнительной операции делает потери веществ неизбежными.

В противоположность сказанному выше обработка O-гликозидных производных оксиаминокислот одновременно метиламином, щелочью и боргидридом натрия приводит к расщеплению O-гликозидных связей и образованию с высоким выходом устойчивых продуктов как из аминокислотной, так и из углеводной части молекулы. После кислотного гидролиза продукты реакции могут быть количественно проанализированы в одной и той же пробе с помощью автоматического анализатора аминокислот.

### Экспериментальная часть

Соединения (I) и (II) получены, как описано ранее [16]. Реакционную смесь, содержащую  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M гликозид (I) (или II), 1,035 M метиламин, 0,25 M или 0,05 M NaOH и, где указано, 0,3 M боргидрида натрия инкубировали при 37 или 22°. Точную концентрацию водного раствора метиламина и щелочи предварительно устанавливали титрованием. Через определенные промежутки времени из реакционной смеси отбирали пробы,

которые быстро охлаждали до комнатной температуры, и избыток метил-амина удаляли упариванием на роторном испарителе без нагревания. Затем анализировали полученные пробы.

К каждой пробе добавляли конц. HCl (до конечной концентрации 6 н.) и проводили гидролиз 24 ч при 105°. В кислотном гидролизате определяли содержание серина (или треонина), N<sup>β</sup>-метилдиаминопропионовой (или N<sup>β</sup>-метилдиаминомасляной) кислоты, глюкозамина и глюкозаминита. Для разделения диаминокислот, глюкозамина и глюкозаминита использовали 0,35 М цитратный буфер, pH 6,03 ± 0,02. Высота колонки — 50 см, скорость элюции — 60 мл/ч [12]. Время удерживания, мин: глюкозамина 94,3 ± 1,7; глюкозаминита 109,6 ± 2,1, N<sup>β</sup>-метилдиаминомасляной кислоты 144 ± 0,7 и 178 ± 2,6, N<sup>β</sup>-метилдиаминопропионовой кислоты 184 ± 1,1. Анализ серина (или треонина) проводили в стандартных условиях.

Данные рис. 1 и 2 и таблицы представляют средние значения из 2—4 определений.

Синтетический образец N-ацетилглюкозаминита получен из N-ацетилглюкозамина по методу [17]. Отличие от методики состояло в добавлении к смеси в начале реакции 1 М метиламина. Выход 95%, т. пл. 151—153°, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> — 13° (с 1, вода). Данные работы [17]: т. пл. 153°, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> — 11°.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Anderson B., Seno N., Sampson P., Riley J. G., Hoffman P., Meyer K. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, PC 2716.
2. Tanaka K., Bertolini M., Pigman W. (1964) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **16**, 404—409.
3. Harbon S., Herman G., Rossignol B., Jolles P., Clauser H. (1964) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **17**, 57—61.
4. Carubelli R., Bhavanandan V. P., Gottshalk A. (1965) *Biochim. et biophys. acta*, **101**, 67—82.
5. Bertolini M., Pigman W. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 3776—3781.
6. Carlson D. M. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 616—626.
7. Weber P., Winzler R. J. (1969) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **129**, 534—538.
8. Simpson D. L., Hranisavljevic J., Davidson E. A. (1972) *Biochemistry*, **11**, 1849—1856.
9. McLean C., Werner D. A., Aminoff D. (1973) *Anal. Biochem.*, **55**, 72—81.
10. Downs F., Herp A., Moschera J., Pigman W. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **328**, 182—192.
11. Колесникова В. Ю., Склянкина В. А., Баратова Л. А., Назарова Т. И., Аваева С. М. (1974) *Вюхимия*, **39**, 287—293.
12. Baratova L. A., Sklyankina V. A., Kolesnikova V. Yu., Awaeva S. M. (1972) *J. Chromatogr.*, **70**, 162—163.
13. Лебедева З. И., Аваева С. М. (1975) *Биоорг. химия*, **1**, 416—418.
14. Lloyd K. O., Kabat E. A., Licerio E. (1968) *Biochemistry*, **7**, 2976—2986.
15. Iyer R. N., Carlson D. M. (1971) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **142**, 101—105.
16. Мирзаянова М. Н., Медведева И. В., Хорлин А. Я. (1975) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, **3**, 697—699.
17. Karrer P., Mayer J. (1937) *Helv. chim. acta*, **20**, 407.

Поступила в редакцию  
23.XII.1974

#### A NEW APPROACH TO THE SELECTIVE CLEAVAGE OF ALKALI LABILE CARBOHYDRATE-PROTEIN LINKAGE IN GLYCOPROTEINS

LEBEDEVA Z. I., BARATOVA L. A., AWAEOVA S. M.,  
MEDVEDEVA I. V., MIRZAYANOVA M. N., KHORLIN A. Ya.

*Laboratory of Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov State  
University, Moscow, M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic  
Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

For the cleavage of O-glycosidic bonds between carbohydrate and hydroxyamino acid residues, a method has been developed which involves the treatment with methylamine alkaline solution in the presence of sodium borohydride and provides stable derivatives both of the amino and carbohydrate moieties. The products resulting from the splitting of O-(2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-N-acetyl-D,L-serine (or threonine) methylamides were analyzed, after acid hydrolysis, in the same sample by means of automatic amino acid analyzer.