



УДК 578.832.1.088.5 : 577.114.5 : 543.422.25

СТРОЕНИЕ ГЛАВНЫХ ОЛИГОМАННОЗИДНЫХ ЦЕПЕЙ
ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА

А/ЛЕНИНГРАД/385/80 (Н3 N2)

Арбатский Н. П., Шапиков А. С., Желтова А. О.,
Юртов Д. В., Деревицкая В. А., Кочетков Н. Б.Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва

С помощью ^1H -ЯМР-спектроскопии установлено строение четырех главных олигоманнозидных углеводных цепей из гемагглютинаина вируса гриппа А/Ленинград/385/80 (Н3N2). На основании полученных данных высказано предположение, что отщепление α -маннозидазой I четырех α -1-2-связанных остатков маннозы при трансформации олигоманнозидной цепи в комплексную является лимитирующей и избирательной стадией процессинга углеводных цепей при биосинтезе гликопротеинов.

Главный поверхностный антиген вируса гриппа — гемагглютинин содержит большое число различающихся по составу и строению углеводных цепей как олигоманнозидного, так и комплексного типов [1-3]. Такая гетерогенность углеводных цепей — явление обычное в гликопротеинах самого различного происхождения [4] — отражает, с одной стороны, особенности их биосинтеза, а с другой — по-видимому, разнообразие выполняемых гликопротеинами функций. Поэтому выяснение особенностей гликозилирования различных гликопротеинов (в том числе вирусных) в различных клетках может оказать большую помощь в понимании многих биологических процессов, протекающих с их участием.

Ранее нами был разработан удобный метод выделения гемагглютинаина вируса гриппа А/Ленинград/385/80 (Н3N2), а также его тяжелой и легкой цепей [5], а затем в результате восстановительного расщепления этих гликопротеинов с помощью щелочного LiNH_2 было выделено большое число индивидуальных олигосахаридов [2]. При этом установлено, что, несмотря на различное число сайтов гликозилирования, тяжелая и легкая цепи гемагглютинаина содержат один и тот же набор (более 20) олигосахаридов комплексного и олигоманнозидного типов в мольном соотношении $\sim 3:1$.

Настоящая работа посвящена установлению строения главных олигоманнозидных фрагментов гемагглютинаина с помощью ^1H -ЯМР-спектроскопии. На основании полученных результатов высказаны некоторые соображения об особенностях биосинтеза углеводных цепей гемагглютинаина.

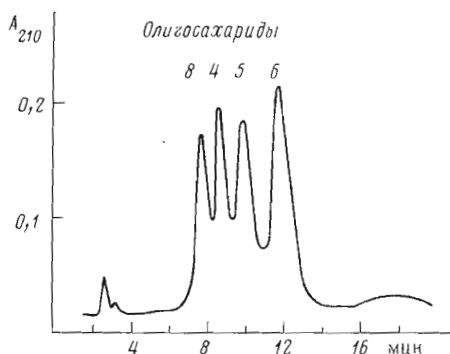


Рис. 1. Хроматография компонентов олигоманнозидной фракции из гемагглютинаина на аминоколонке (Alltech NH_2 , $4,6 \times 250$ мм); элюент — метанол — вода (3:1), детекция при 210 нм, скорость элюции 0,8 мл/мин

Среди выделенных с помощью ВЭЖХ восстановленных олигосахаридов олигоманнозидного типа четыре главных олигосахарида, обозначенных как олигосахариды 4, 5, 6 и 8 [2] (рис. 1), составляют более 80% общего количества олигоманнозидной фракции, причем относительное содержание каждого из них примерно одинаково. Анализ моносахаридного состава показал [2], что олигосахариды 8, 4, 5 и 6 отличаются друг от друга только на один остаток маннозы и содержат соответственно 6, 7, 8 и 9 моль маннозы на 1 моль N-ацетилглюкозамина и 1 моль N-ацетилглюкозаминита.

Состав и индивидуальность полученных олигосахаридов были подтверждены с помощью ^1H -ЯМР-спектроскопии. В спектрах всех четырех олигосахаридов при δ 2,05–2,10 м.д. имелись сигналы от 6 протонов двух N-ацетильных групп остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилглюкозаминита, а в низкочастотной области — соответственно 7, 8, 9 и 10 сигналов протонов H1 остатков маннозы и N-ацетилглюкозамина (рис. 2–5). Строение олигосахаридов вытекало из сравнения ЯМР-спектров исследуемых олигосахаридов с имеющимися в литературе данными для аналогичных структур. При этом был использован метод «отпечатков пальцев», широко применяемый в ^{13}C -ЯМР-спектроскопии [7]. Как было показано ранее [8], химические сдвиги аномерных протонов для остатков маннозы в различном окружении оказываются достаточно характеристичными для определения этого окружения. Поскольку точное воспроизведение условий съемки олигосахаридов, приведенных в литературе, не всегда возможно, мы использовали в качестве основного критерия положение химических сдвигов аномерных протонов остатков α -маннозы (A, B, C, D₁, D₂ и D₃) относительно постоянных сигналов H1 остатков маннозы (3, 4 и 4') и N-ацетилглюкозамина (2)*. Учитывалась также величина $\text{KCCB}^3 J_{\text{H1-H2}}$ моносахаридных остатков. Такой подход позволяет по указанным выше параметрам исключить различные варианты структуры олигосахарида и выбрать наиболее вероятный.

Олигосахарид, содержащий 9 остатков маннозы, выделялся многими авторами из гликопротеинов различного происхождения, и структура его надежно установлена (рис. 2, структура 1) [9]. Сопоставление имеющихся в литературе данных ^1H -ЯМР-спектров [6] гликопептидов, содержащих олигосахаридную цепь такого типа, с данными, полученными нами для олигосахарида 6, показало почти полное совпадение картины распределения химических сдвигов аномерных протонов, а следовательно, и идентичность структур олигосахаридов 6 и I.

Для олигосахарида 8, содержащего 6 остатков маннозы, в принципе может существовать несколько вариантов структуры. Наиболее вероятными, в соответствии с представлениями о биосинтезе углеводных цепей гликопротеинов [6, 9, 10], являются структуры II–V. Сравнение полученных экспериментально величин химических сдвигов H1 олигосахаридов 8 с известными литературными данными [6] для различных изомерных структур (рис. 3) показывает, что структуры II и V можно сразу исключить из числа рассматриваемых вариантов строения олигосахарида 8. Наиболее близкими к полученному нами распределению сигналов H1 олигосахарида 8 являются данные ЯМР-спектров для структур III и IV, однако сигнал при $\delta \sim 5,35$ м.д. свидетельствует об идентичности олигосахарида 8 структуре IV. Важно, что сигнал при $\delta \sim 5,35$ м.д. характерен также и для олигосахаридов 4 и 5.

Аналогичным образом из сравнения экспериментальных и литературных данных [6] о распределении химических сдвигов аномерных протонов олигосахаридов 4 и 5 и ряда изомерных олигосахаридов была установлена структура олигосахаридов, содержащих 7 и 8 остатков маннозы, первый из которых идентичен структуре VII (рис. 4), а второй — структуре XI (рис. 5).

Полученные данные о строении главных олигоманнозидных цепей гемагглютинина позволяют сделать некоторые предположения о началь-

* Моносахаридные остатки обозначены по принятой классификации [6], см. структуру I, рис. 2.

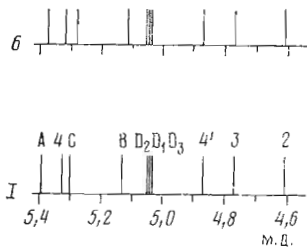


Рис. 2

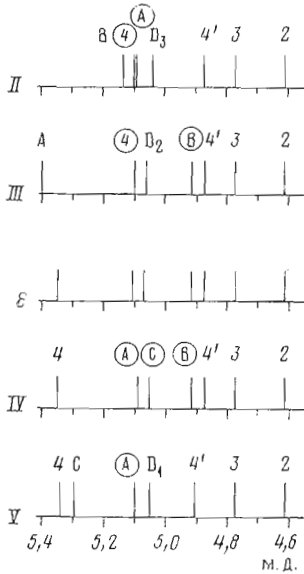


Рис. 3

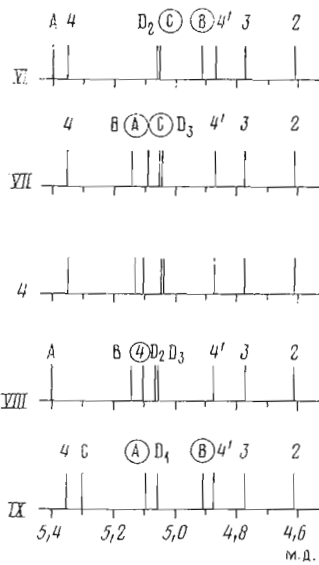


Рис. 4

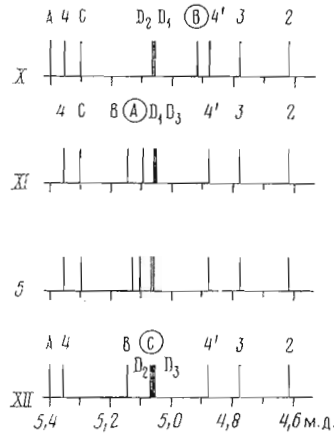


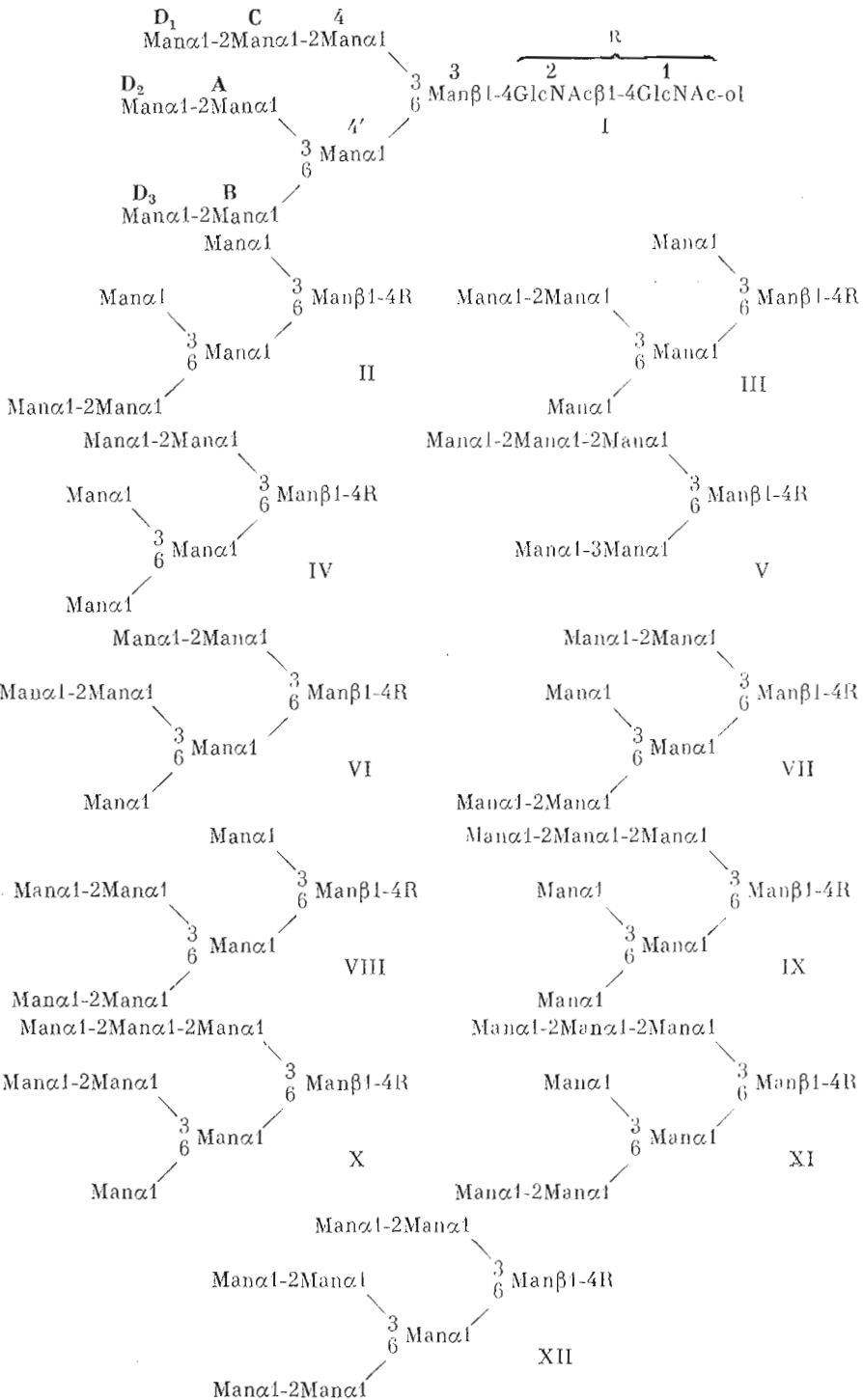
Рис. 5

Рис. 2. Положение химических сдвигов аномерных протонов в ^1H -ЯМР-спектрах олигосахаридов 6 и аналогичного ему олигосахаридов I, содержащего 9 остатков маннозы [6]

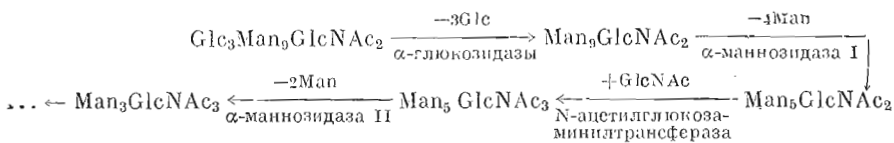
Рис. 3. Положение химических сдвигов аномерных протонов в ^1H -ЯМР-спектрах олигосахаридов 8 и изомерных олигосахаридов II-V, содержащих 6 остатков маннозы [6]. Обозначения сигналов остатков маннозы, которые в структурах II-V являются терминальными (в отличие от структуры I, где они замещены), заключены в кружок

Рис. 4. Положение химических сдвигов аномерных протонов в ^1H -ЯМР-спектрах олигосахаридов 4 и изомерных олигосахаридов VI-IX, содержащих 7 остатков маннозы [6]. Пояснения см. в подписи к рис. 3

Рис. 5. Положение химических сдвигов аномерных протонов в ^1H -ЯМР-спектрах олигосахаридов 5 и изомерных олигосахаридов X-12, содержащих 8 остатков маннозы [6]. Пояснения см. в подписи к рис. 3



ных этапах превращения олигоманнозидной цепи в комплексную при биосинтезе гемагглютинина. Предполагается, что трансформация углеводной цепи после ее переноса липидом-переносчиком на пептид начинается с отщепления трех остатков глюкозы (схема) [9, 10]. Затем под действием так называемой α -маннозидазы I последовательно отщепляются четыре α -1-2-связанных остатка маннозы [10], в результате чего образуется ключевая промежуточная структура с формулой $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, которая участвует в последующих превращениях, заканчивающихся образованием комплексной цепи.



Как уже отмечалось, среди выделенных нами из гемагглютинина вируса гриппа олигоманнозидных цепей главными являются олигосахариды типа $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (6), $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (5), $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ (4) и $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ (8) *. В то же время промежуточные олигосахариды, содержащие глюкозу или цепи типа $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_3$, $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_3$, в заметных количествах не были обнаружены. Известно также, что такие типы цепей крайне редко выделяют из гликопротеинов [14]. Таким образом, отщепление остатков глюкозы от олигоманнозидного предшественника $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, перенос соответствующей гликозилтрансферазой остатка GlcNAc на цепь $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ и последующее отщепление двух остатков Man (см. схему), очевидно, не встречают каких-либо затруднений, тогда как отщепление α -1-2-связанных остатков маннозы является, по-видимому, лимитирующей стадией.

Из полученных данных вытекает также, что имеется определенная последовательность отщепления α -1-2-связанных остатков маннозы. Тот факт, что из нескольких возможных изомерных цепей типа $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ и $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ в гемагглютинине вируса гриппа в ходе процессинга образуются почти исключительно цепи, соответствующие олигосахаридам 5, 4 и 8, указывает на довольно строгую последовательность отщепления α -1-2-связанных остатков маннозы: сначала отщепляется преимущественно остаток D_2 , затем D_1 и наконец D_3 . Таким образом, можно предположить, что стадия отщепления α -1-2-связанных остатков маннозы является не только лимитирующей, но и избирательной.

Аналогичный вывод о порядке отщепления остатков маннозы сделан в результате изучения олигоманнозидных цепей из мембранных гликопротеинов яйцеклеток китайского хомячка [12], вируса болезни Ньюкасла [13] и плаценты человека [14], хотя в ряде работ [13, 15] не отвергается и альтернативный путь трансформации.

Причины, обуславливающие указанную выше последовательность отщепления α -1-2-связанных остатков маннозы, остаются неясными. Вероятно, они связаны со стерическими факторами, т. е. с различной доступностью для α -маннозидазы I остатков маннозы D_1 , D_2 и D_3 . Возможно также, что участвующий в этом процессе фермент (или ферменты?) обладает различной специфичностью к изомерным субстратам типа $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2 - \text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$. Эти вопросы могут быть разрешены только путем дальнейшего изучения биосинтеза гликопротеинов.

Экспериментальная часть

0,2–0,3 мкмоль высушенного в вакууме из $^2\text{H}_2\text{O}$ олигосахарида растворяли в 0,5 мл $^2\text{H}_2\text{O}$. Спектры ЯМР получены на приборе WM-250 Bruker при 80°C в условиях подавления сигнала HDO. В зависимости от концентрации олигосахарида число накоплений составляло 200–400. Химические сдвиги измерены относительно внутреннего стандарта — Na-соли 4-(диметилсилил)пентансульфоновой кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Derevitskaya V., Arbatsky N., Likhoshesterov L., Novikova O., Senchenkova S.* In: Abstract of the XIIth International carbohydrate symposium/Eds Vliegenthart J. F. G., Kamerling J. P., Weldink G. A. Utrecht: Vonk Publishers, 1984. p. 416.

* Хотя олигосахарида $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ нет среди главных олигосахаридов, среди минорных имеется олигосахарид 10 [2], отвечающий такому составу.

2. Арбатский Н. П., Желтова А. О., Лихошерстов Л. М., Сенченкова С. Н., Юртов Д. В., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. Биорган. химия, 1985, т. 11, № 6, с. 837–844.
3. Matsumoto A., Yoshima H., Kobata A. Biochemistry, 1983, v. 22, № 1, p. 188–196.
4. Hatton M. W. C., März L., Regecz E. Trend. Biochem. Soc., 1983, v. 8, № 8, p. 287–291.
5. Арбатский Н. П., Лихошерстов Л. М., Медведев С. А., Новикова О. С., Сенченкова С. П., Юртов Д. В., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. Докл. АН СССР, 1983, т. 271, № 5, с. 1257–1260.
6. Vliegenthart J. F. G., Dorland L., van Halbeek H. In: Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry/Eds Tipson R. S., Horton D. N. Y.–L.: Acad. Press, 1983, v. 41, p. 209–374.
7. Gorin P. A., Spencer J. F. Can. J. Microbiol., 1972, v. 18, p. 1709–1715.
8. Allton C., Haasnoot C. A. G. Organic Magn. Resonance, 1980, v. 13, № 6, p. 417–429.
9. Schachter H., Roseman S. In: The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans/Ed. Lennarz W. J. N. Y.: Plenum Press, 1980, p. 85–127.
10. Kornfeld S., Li E., Tabas J. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 24, p. 7771–7778.
11. Montreuil J. Comprehensive Biochemistry/Eds Neuberger A., van Deenen L. L. M. Amsterdam, Oxford, N. Y.: Elsevier Scientific Company, 1982, v. 19B, part II, p. 61–62.
12. Li E., Kornfeld S. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 5, p. 1600–1605.
13. Diabate S., Geyer R., Stirm S. Eur. J. Biochem., 1984, v. 139, № 2, p. 329–336.
14. Henner J. A., French W. C., Bahl O. P. Arch. Biochem. and Biophys., 1983, v. 224, № 2, p. 601–613.
15. Geyer K., Geyer H., Egge H., Schott H. H., Stirm S. Eur. J. Biochem., 1984, v. 143, № 3, p. 531–539.

Поступила в редакцию
29.IV.1985

THE STRUCTURE OF MAJOR OLIGOMANNOSIDIC CHAINS OF INFLUENZA VIRUS A/LENINGRAD/385/80 (H3N2) HEMAGGLUTININ

ARBATSKY N. P., SHASHKOV A. S., ZHELTOVA A. O., IURTOV D. V.,
DEREVITSKAYA V. A., KOCHETKOV N. K.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

The structure of four main oligomannosidic carbohydrate chains isolated from influenza virus A/Leningrad/385/80 (H3N2) hemagglutinin has been elucidated using ¹H NMR spectroscopy. The data obtained suggest that splitting off four α 1–2 linked mannose residues under α -mannosidase action is the limiting and selective stage of transformation of high mannose carbohydrate chain to complex chain during biosynthesis of glycoproteins.