



УДК 547.458'.233.1'814.1.057:577.336:577.112.853

**ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ УГЛЕВОДОВ
В СТРУКТУРНОМ АНАЛИЗЕ ГЛИКОКОНЪЮГАТОВ.
N-(4-МЕТИЛКУМАРИН-7-ИЛ)ГЛИКАМИНЫ В ИЗУЧЕНИИ
АСПАРАГИНСВЯЗАННЫХ УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ
ГЛИКОПРОТЕИНОВ**

*Хорлин А. Я., Шиян С. Д., Насонов В. В.,
Маркин В. А.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

N-(4-Метилкумарин-7-ил)гликамины использованы в изучении аспарагиссвязанных углеводных цепей аспалофетуина, полученного кислотным деспалированием фетуина. Оптимизирована методика восстановительного аминирования олигосахаридов 7-амино-4-метилкумарином (АМК) в присутствии NaCNBH_3 , приводящего к АМК-олигосахаридам (АМК-ОС). АМК-ОС получены из олигосахаридов декстрана и олигосахаридов, образующихся при гидролизе из аспарагиссвязанных углеводных цепей аспалофетуина. Предложено разделение АМК-ОС с помощью обращенно-фазовой и эксклюзионной ВЭЖХ и флуориметрическое определение их мольного соотношения. Калибровка колонки TSK G 2000 SW с помощью АМК-ОС декстрана отвечала линейной зависимости $\ln N_i = k(t_i/t_r) + b$, где t_i/t_r — время удерживания АМК-ОС относительно АМК-трисахарида, N_i — число калибровочных единиц, характеризующее молекулярный размер АМК-ОС. Из аспалофетуина получены три АМК-ОС: $\text{Gal}_3\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{AMK}$ (I) и (II) и $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{AMK}$ (III) в мольном отношении 1:1,8:0,1. Последовательное действие β -галактозидазы и β -N-ацетилгексозаминидазы из *Canavalia ensiformis* дало в качестве конечных продуктов ферментализа АМК-ОС (II) и (III) АМК-фрагменты состава $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{AMK}$, а ферментализа АМК-ОС (I) — $\text{GalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2\text{AMK}$, что указывает на структурные отличия одной из ветвей данной N-углеводной цепи аспалофетуина. Определение моносахаридного состава и экзогликозидазное секвенирование осуществлены на 100-пикомольном уровне.

Трудная доступность биологически важных гликопротеинов, сложность строения и гетерогенность их углеводных цепей диктуют необходимость миниатюризации методов их изучения, что в свою очередь требует развития высокочувствительных методов анализа углеводов и разработки путей их эффективного использования. В немногочисленных публикациях последних лет показана перспективность сочетания избирательной деградации углеводных цепей с ВЭЖХ флуоресцентномеченных продуктов деградации. В качестве таковых хорошо зарекомендовали себя гликамины, получаемые восстановительным аминированием углеводов 2-аминопиридином, 7-амино-4-метилкумарином (АМК) (см. [1] и приведенную там библиографию), а также 7-амино-1-нафтолом [2]. Описана ВЭЖХ олигосахаридов из аспарагиссвязанных углеводных цепей гликопротеинов, меченных аминопиридином [3–5], а также магнозидозных олигосахаридов, меченных амионафтолом [2]. В работе [5] предложена схема изучения структуры углеводных цепей на уровне нескольких сот пикомоль, использующая аминопиридиновую метку.

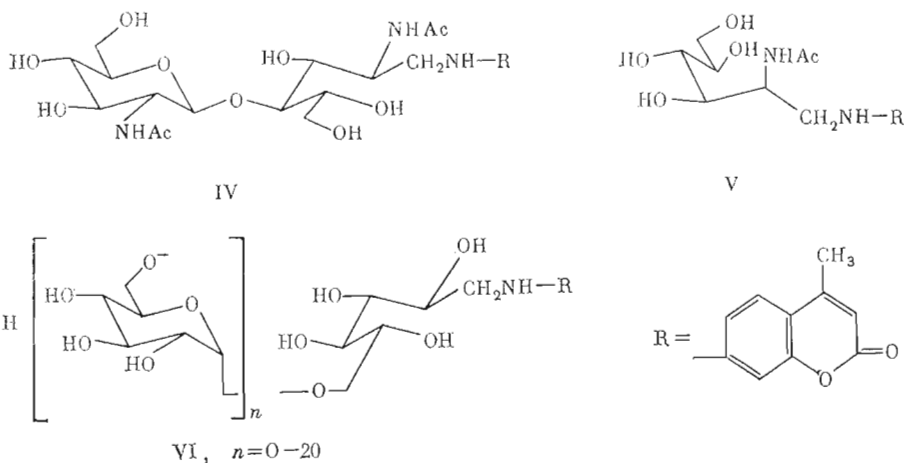
Ранее нами описано применение АМК-метки для определения моносахаридного состава гликоконъюгатов с предельной чувствительностью анализа 5 фмоль [1]. В данном сообщении обсуждаются результаты применения АМК-метки в исследовании аспарагиссвязанных углеводных цепей гликопротеинов. Найдены оптимальные условия получения N-(4-метилкумарин-7-ил)гликаминов из олигосахаридов (АМК-ОС), из аспалофетуина получены АМК-ОС (I)–(III) и осуществлено их экзогликози-

Сокращения: АМК — 7-амино-4-метилкумарин, АМК-ОС — N-(4-метилкумарин-7-ил)гликамины олигосахаридов, DMF — диметилформамид.

дазное секвенирование. Показано, что АМК-метка может служить основой для создания высокочувствительных схем анализа структуры аспарагинсвязанных углеводных цепей гликопротеинов.

Получение АМК-олигосахаридов, как и АМК-моносахаридов [1], основано на восстановительном аминировании сахаров действием АМК в присутствии цианоборгидрида натрия. Для подбора оптимальных условий реакции была проведена серия экспериментов, в которых варьировались рН, температура, а также соотношение (концентрация) реагентов. В качестве модельного олигосахарида была взята *N,N'*-диацетилхитобиоза — обязательный фрагмент коровой части *N*-углеводных цепей гликопротеинов. Реакцию проводили в смеси DMF — вода (1 : 1, по объему), выходы АМК-хитобиозы (IV) определялись по соотношению на хроматограммах площадей пиков АМК-ОС (IV) и АМК-ManNAc (V), вводимые в реакционную смесь в качестве внутреннего стандарта. Поскольку ранее было показано [1], что строение углеводной части АМК-сахаров практически не влияет на их флуоресценцию, отношение площадей пиков АМК-ОС при их флуориметрическом определении отражает молярное отношение соединений. Найденные оптимальные условия (рН 6,2, преникубация олигосахарида с избытком 40 мМ раствора АМК в воде DMF в течение 4 ч при 40°С и последующая инкубация при 40°С в течение суток с большим избытком NaCNBH₃) обеспечивали выход АМК-ОС до 95% (см. «Экспериментальную часть») и в наших руках показали хорошие результаты при получении большого ряда различных АМК-олигосахаридов.

Для калибровки хроматографических колонок при эксклюзионной ВЭЖХ был получен набор АМК-ОС (VI) из олигосахаридов декстрана, образующихся при частичном гидролизе полисахарида 0,1 М трифторуксусной кислотой [6].



АМК-ОС из *N*-углеводных цепей аспалофетуина получали следующим образом: коммерческий препарат фетуина подвергали кислотному деацелированию в стандартных условиях [7], аспалофетуин обрабатывали проназой и образовавшиеся гликопептиды, содержащие аспарагинсвязанные углеводные цепи, выделяли с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-25. Определение моносахаридного состава с помощью ГЖХ триметилсилиловых эфиров метилгликозидов после метанолиза показало, что гликопептидная фракция содержала галактозу, маннозу и *N*-ацетилглюкозамин в молярном отношении 2,9 : 3,0 : 4,8, что отвечало составу трехантенных углеводных цепей лактозаминового типа. Далее гликопептидная фракция подвергалась гидразиолизу, образовавшиеся гидразиды олигосахаридов разрушали бензальдегидом и *ре-N*-ацетилировали [8]. Гидразиолиз гликопептидов в сравнении с гидразиолизом гликопротеина существенно уменьшал загрязнение олигосахаридов и облегчал их дальнейшую очистку. Превращение полученных олигосахаридов в АМК-

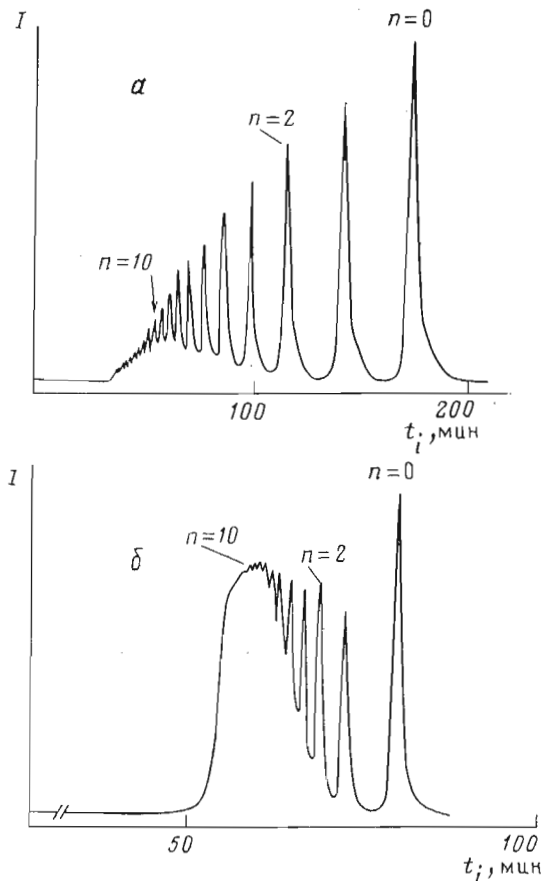


Рис. 1. ВЭЖХ АМК-олигосахаридов (VI) декстрана на колонке Силасорб С 18, 10 мкм, 25×310 мм, элюция 9% водным ацетонитрилом, 6,7 мл/мин, 20° С (а), на колонке TSK G 2000 SW, условия см. в примечании 4 к таблице (б)

производные осуществлялось по общей методике (см. выше), полученную фракцию АМК-ОС перед ВЭЖХ очищали хроматографией на био-геле Р-4.

Хроматография АМК-олигосахаридов. Для аналитической хроматографии АМК-ОС использовали колонки TSK G 2000 SW (эксклюзионная хроматография) и Ultrasphere C18 (обращенно-фазовая хроматография). Препаративное разделение АМК-ОС, полученных из олигосахаридов декстрана, осуществлялось на силасорбе С18; для препаративной ВЭЖХ АМК-ОС из аспарагинсвязанных углеводных цепей аспалофетуина использовалась Zorbax C18. При аналитической эксклюзионной хроматографии наблюдалось четкое разделение АМК-производных декстрановых олигосахаридов вплоть до АМК-ундекасахарида, а при обращенно-фазовой ВЭЖХ — и до более высоких олигомеров (рис. 1). Хроматографическая подвижность соединений характеризовалась относительными временами удерживания (см. таблицу). Существенный интерес представляло выявление зависимости хроматографического поведения АМК-ОС от их молекулярных размеров. Нами найдено, что при эксклюзионной ВЭЖХ относительные времена удерживания АМК-ОС (VI) связаны линейной зависимостью с логарифмом их степени полимеризации (рис. 2). Это дало возможность с помощью АМК-ОС (VI) откалибровать колонку TSK G 2000 SW и в дальнейшем характеризовать молекулярный размер исследуемого АМК-ОС числом условных калибровочных единиц, которое для данной колонки и данного элюента хорошо воспроизводилось в интервале температур 20–30° С и подчинялось соотношению

$$\ln N_i = k(t_i/t_r) + b, \quad (1)$$

Состав и хроматографическая характеристика АМК-олигосахаридов из аспарагинсвязанных углеводных цепей асиалофетуина и продукты их ферментативного гидролиза

АМК-ОС *	Моносахаридный состав Gal : Man : GlcNAc		$t_{отн}^{3*}$	t_i/t_r^{1*}	N_i^{5*}	
	найдено ^{2*}	теор.			найдено	вычислено
I	3,0 : 3,0 : 4,3	3 : 3 : 5	0,91	0,7656	19,6	19,6
II	3,2 : 3,0 : 5,2	3 : 3 : 5	1,00	0,7677	19,2	19,6
III	2,3 : 3,0 : 4,9	2 : 3 : 5	1,12	0,7758	18,0	18,1
I/1	—	2 : 3 : 5	1,02	0,7751	18,1	18,1
I/2	1,3 : 3,0 : 5,0	1 : 3 : 5	1,13	0,7837	16,9	16,6
I/2,1	—	1 : 3 : 4	1,20	—	—	14,7
I/2,2	—	1 : 3 : 3	1,30	0,8150	13,2	12,8
II/1	—	2 : 3 : 5	1,13	0,7790	17,6	18,1
II/2	—	1 : 3 : 5	1,22	0,7906	16,0	16,6
II/3	0,1 : 3,0 : 4,2	0 : 3 : 5	1,35	0,8016	14,7	15,1
II/3,1	—	0 : 3 : 4	1,45	—	—	13,2
II/3,2	—	0 : 3 : 3	1,52	0,8303	11,7	11,3
II/3,3	0,0 : 3,0 : 4,9	0 : 3 : 2	1,63	0,8584	9,3	9,4
III/1	—	1 : 3 : 5	1,22	0,7906	16,0	16,6
III/2	—	0 : 3 : 5	1,35	0,8016	14,7	15,1
IV	—	0 : 0 : 2	—	0,9387	4,9	4,9

* Цифры после косой линии обозначают число отщепленных остатков галактозы и (после запятой) остатков N-ацетилглюкозамина.

^{2*} В виде АМК-моносахаридов [1], моль/моль Man.

^{3*} Аналитическая обращенно-фазовая ВЭЖХ, колонка Ultrasphere ODS, 4,6×250 мм, элюция 12% водным ацетонитрилом, 0,9 мл/мин, 27° С, время удерживания относительно АМК-ОС (II).

^{1*} Аналитическая эксклюзионная ВЭЖХ, колонка TSK G 2000 SW, 7,5×300 мм, элюция 7% водным этанолом, 0,2 мл/мин, 30° С, время удерживания относительно АМК-ОС (VI, $n=2$).

^{5*} Найденное N_i рассчитано по соотношению $\ln N_i = -7,9796 t_i/t_r + 9,0828$, вычисленное N_i рассчитано с применением инкрементов $\Delta N_{Gal} = \Delta N_{Man} = 1,5$, $\Delta N_{GlcNAc} = 1,9$, $\Delta N_{GlcNAcAMK} = 3$.

где N_i — число калибровочных единиц, t_i — время удерживания исследуемого АМК-ОС, t_r — время удерживания АМК-ОС (VI, $n=2$). Полагая N_i численно равным степени полимеризации олигосахаридов декстрана, из которых были получены АМК-ОС (VI), мы с использованием метода наименьших квадратов определили в соотношении (1) значения коэффициента $k = -7,9796$ и константы $b = 9,0828$ для наших рабочих условий (см. таблицу). Среднеквадратичное отклонение найденных относительных времен удерживания АМК-ОС (VI) от вычисленных по соотношению (1) с использованием приведенных значений k и b составляло менее 1%. Характеристика АМК-ОС величинами N_i оказалась полезной при изучении N-углеводных цепей асиалофетуина.

Аспарагинсвязанные углеводные цепи асиалофетуина. Фетуин — α -глобулин сыворотки эмбрионов теленка — содержит три трехантенные аспарагинсвязанные углеводные цепи лактозаминного типа. Несмотря на доступность гликопротеина, вопрос о структуре этих цепей не решен окончательно (см. [9] и приведенную там библиографию). В работе [9] с помощью ЯМР показано, что к остатку Man $\alpha 1 \rightarrow 3$ пентасахаридного кора присоединены глюкозаминидными связями $\beta 1 \rightarrow 2$ и $\beta 1 \rightarrow 4$ две антенны, в то время как остаток Man $\alpha 1 \rightarrow 6$ связан с одной антенной $\beta 1 \rightarrow 2$ -глюкозаминидной связью, и что на восемь лактозамининовых блоков Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc в углеводных цепях приходится один изолактозамининовый блок Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GlcNAc. Современные данные о структуре N-углеводных цепей фетуина суммированы в формуле (VII):

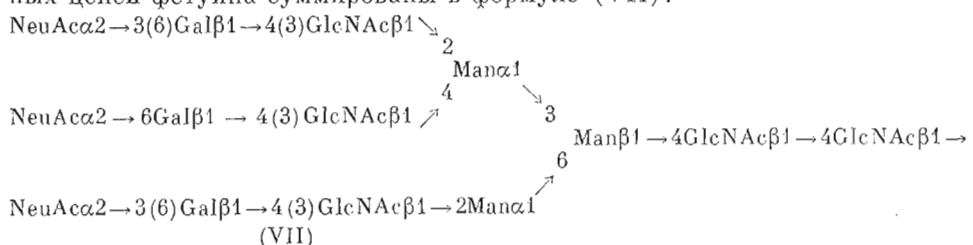


Рис. 2. Полулогарифмическая зависимость числа калибровочных единиц N_i от относительных времен удерживания АМК-олигосахаридов (VI, $n=1-8$) декстрана при эксклюзионной ВЭЖХ на колонке TSK G 2000 SW. Условия см. в примечании 4 к таблице

Рис. 3. ВЭЖХ АМК-ОС (I)–(III) (а) и продуктов их ферментативного гидролиза (2 ч) β -галактозидазой (б, г, д) и β -N-ацетилглюкозаминидазой (е, е). Колонка Ultrasphere C 18, условия см. в примечании 3 таблицы, обозначения – см. примечание 1 таблицы

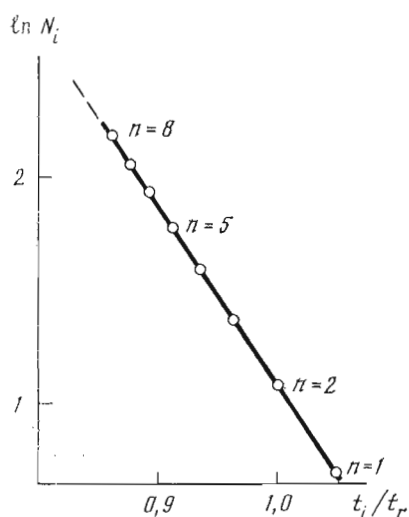


Рис. 2

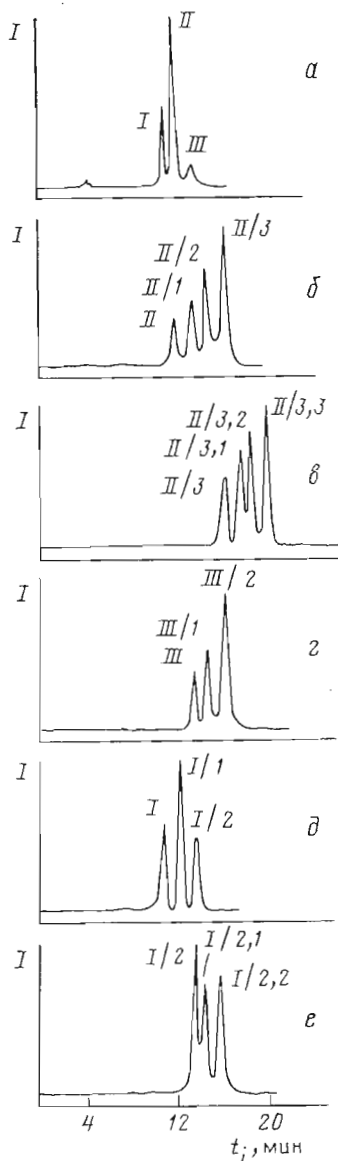


Рис. 3

Эта структура хорошо согласуется с современными представлениями о процессинге аспарагинсвязанных углеводных цепей сложного (лактозаминowego) типа [10], согласно которым остаток $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4$ присоединяется к остатку $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3$ пентасахаридного кора только после присоединения двух остатков $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$ к коровым остаткам $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3$ и $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6$. Приведенные в работе [9] данные ЯМР прямо указывают на гетерогенность N-углеводных цепей асиалофетуина. Однако сведения о числе изомерных цепей и количественном их соотношении отсутствуют.

Аналитическая обращенно-фазовая ВЭЖХ АМК-ОС из аспарагинсвязанных цепей асиалофетуина выявила три АМК-производных олигосахаридов: АМК-ОС (I), АМК-ОС (II) и АМК-ОС (III) в мольном отношении 1:1,8:0,1 (рис. 3а). С помощью препаративной ВЭЖХ на колонке Zorbax C18 эти производные были выделены в индивидуальном состоянии. При кислотном гидролизе каждого из них 4 н. соляной кислотой при 100°C в течение 4 ч была обнаружена АМК-хитобиоза (IV), количество которой уменьшалось с увеличением продолжительности гидролиза. Это прямо подтверждало, что АМК-ОС (I)–(III) получены из олиго-

сахаридов, не подвергшихся деградации в процессе гидразинолиза гликопептидов аспалофетуина (ср. [11]). Моносахаридный состав АМК-ОС (I)–(III) был определен с помощью ранее описанного нами метода [1], их молекулярный размер охарактеризован числом калибровочных единиц по результатам аналитической эксклюзионной хроматографии. Полученные данные приведены в таблице.

Как видно из таблицы, АМК-ОС (I) и (II) имеют одинаковый состав, соответствующий трехантенным олигосахаридам лактозаминного типа, и характеризуются близкими значениями N_i (таблица). АМК-ОС (III) содержит на один остаток галактозы меньше (таблица), его происхождение скорее всего следует объяснить частичным дегалактозилированием углеводных цепей при кислотном десиакировании фетуина. Действительно, обработка АМК-ОС (II) кислотой в стандартных условиях десиакирования привела к образованию небольшого количества АМК-производного, совпадающего по хроматографическому поведению на колонке Ultraspher C18 с АМК-ОС (III).

Структурная характеристика АМК-ОС (I)–(III) была осуществлена с помощью экзогликозидазного секвенирования. Для этой цели использовались коммерческие препараты β -галактозидазы и β -N-ацетилгексозаминидазы из бобов *Canavalia ensiformis*. Агликоновая специфичность обоих ферментов достаточно подробно изучена. Так, соотношение скоростей гидролиза $1 \rightarrow 6$ -, $1 \rightarrow 4$ - и $1 \rightarrow 3$ -дисахаридов Gal $\beta 1 \rightarrow$ GlcNAc β -галактозидазой составляет соответственно 100:75:1 [12]. Гексозаминидаза обладает широкой специфичностью [12].

За ходом гликозидазного расщепления АМК-ОС следили с помощью аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ. Отдельные продукты ферментативного гидролиза выделялись с помощью препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Zorbax C18; для них определялся моносахаридный состав; кроме того, их молекулярный размер характеризовался числом калибровочных единиц. На рис. 3 и в таблице представлены результаты экзогликозидазного секвенирования.

Энзиматическое дегалактозилирование АМК-ОС (II) проходило через две промежуточные стадии — моно- (АМК-ОС (II/1)) и дидегалактозилирования (АМК-ОС (II/2)) с получением конечного продукта дегалактозилирования АМК-ОС (II/3), не содержащего галактозу (рис. 3б, таблица). Последующая обработка АМК-ОС (II/3) гексозаминидазой также через две промежуточные стадии (АМК-ОС (II/3,1) и АМК-ОС (II/3,2)) приводила к конечному продукту гидролиза АМК-ОС (II/3,3) (рис. 3в, таблица), моносахаридный состав которого отвечал ожидаемому пентасахаридному кору аспарагинсвязанных углеводных цепей. Эти результаты указывают на трехантенную структуру АМК-ОС (II), что находится в полном согласии с литературными данными.

Минорный АМК-ОС (III), идентичный по хроматографическому поведению продукту энзиматического монодегалактозилирования АМК-ОС (II/1), через одну стадию образования АМК-ОС (III/1), не отличимого от АМК-ОС (II/2), давал продукт полного дегалактозилирования АМК-ОС (III/2), идентичный АМК-ОС (II/3) (рис. 3г, таблица).

Иным было поведение АМК-ОС (I). Гидролизом его β -галактозидазой через стадию образования АМК-ОС (I/1) получали предельный продукт дегалактозилирования АМК-ОС (I/2) (рис. 3д, таблица), который по составу отвечал продукту дидегалактозилирования. Дальнейшее расщепление АМК-ОС (I/2) гексозаминидазой через стадию промежуточного образования АМК-ОС (I/2,1) приводило к конечному продукту ферментолитиза АМК-ОС (I/2,2) (рис. 3е, таблица). Таким образом, в результате последовательного действия на АМК-ОС (I) галактозидазы и гексозаминидазы осталась интактной одна из трех антенн. Принимая во внимание литературные данные [9] и агликоновую специфичность использованной β -галактозидазы, в этой интактной антенне можно предположить наличие изолактозаминного блока Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GlcNAc. Наличие Gal $\beta (1 \rightarrow 3)$ GlcNAc в одной из антенн аспарагинсвязанных углеводных цепей фетуина из сыворотки теленка показано также японскими исследователями [13].

Найденные величины N_i , характеризующие молекулярный размер АМК-ОС, позволили оценить вклады в эту величину отдельных моносахаридов (см. примечание 5 к таблице). Вычисленные с помощью этих инкрементов значения N_i близко отвечали найденным. Использование таких инкрементов для оценки моносхаридного состава АМК-ОС по их хроматографическому поведению при эксклюзионной ВЭЖХ было полезным при анализе результатов экзогликозидазного секвенирования.

Таким образом, полученные нами данные показывают, что аспарагинсвязанные углеводные цепи аспалофетуина представлены двумя видами трехантенных олигосахаридов: главным (~62%), содержащим исключительно лактозаминовые блоки, и вторым, изомерным ему олигосахаридом (~35%), отличающимся строением одной из антенн. Поскольку гликопротеин имеет три аспарагинсвязанные углеводные цепи, можно предположить, что каждый из гликозилированных аспарагиновых остатков несет одну углеводную цепь строго определенной структуры, причем две из них одинаковы либо все три сайта гликозилирования гетерогенны по структуре своих углеводных цепей, которые в каждом случае представлены двумя видами олигосахаридов. Окончательное решение вопроса о структуре N-углеводных цепей аспалофетуина требует изучения его гликопептидов, содержащих один сайт гликозилирования.

В заключение необходимо отметить высокую чувствительность использованных в работе методов. Так, получение и характеристика АМК-ОС могли быть выполнены на 100-пикомольном уровне, а на один шаг экзогликозидазного секвенирования требовалось всего 5–10 пмоль АМК-ОС. Такая чувствительность вполне сопоставима с чувствительностью методов, использующих тритиевую метку, широко применяемую в исследованиях углеводной составляющей гликоконъюгатов. Однако методы, использующие флуоресцентную АМК-метку, при хорошей воспроизводимости и высокой чувствительности характеризуются еще и большими удобствами и быстротой.

Экспериментальная часть

ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе Du Pont 8800 (США), снабженном проточным флуориметром FS 970 (Shoefell, ФРГ) и интегратором Du Pont SP 4100, на аналитических колонках TSK G 2000 SW и Ultrasphere ODS (Altex, США). Условия разделения см. в примечаниях к таблице. Для препаративного разделения использовали колонки: Силасорб С18 (Сетарол, ЧССР; условия см. в подпункте к рис. 1а) и Zorbax ODS (Du Pont; 9,4×250 мм, элюция 10% водным ацетонитрилом, 3,8 мл/мин, 20°С). ГЖХ осуществляли как описано ранее [14]. Очистку растворителей и жидких реактивов осуществляли как описано ранее [1].

Использовали фетуин сыворотки эмбрионов теленка (Sigma, США), β -галактозидазу (КФ 3.2.1.23) и β -N-ацетилглюкозаминидазу (КФ 3.2.1.30) Jack bean meal (Sigma), проназу (Serva, ФРГ), NaCNBH_3 (Fluka, Швейцария). N,N'-Диацетилхитобиоза получена гидролизом хитина [15]. 7-Амино-4-метилкумарин получен и очищен как в работе [1].

Оптимизация метода получения АМК-олигосахаридов. Влияние pH. К смеси DMF – вода (1:1, по объему) добавляли уксусную кислоту до нужного pH. Готовили смеси с pH 3,5; 4,5; 5,5; 5,8; 6,0; 6,2; 6,5; 7,0; 7,5, в смесях растворяли АМК (20 мкмоль/мл). Аликвоту водного раствора, содержащую по 10 нмоль N,N'-диацетилхитобиозы и АМК-ManNAc [1], помещали в ампулу, упаривали досуха, к остатку прибавляли 50 мкл (1000 нмоль) раствора АМК и выдерживали раствор в запаянной ампуле 4 ч при 40°С, после преникубации ампулу вскрывали, добавляли 5 мкл 2% метанольного раствора NaCNBH_3 и выдерживали сутки при 40°С, затем обрабатывали уксусной кислотой и метанолом для разложения цианоборгидрида и удаления борной кислоты как описано [1], остаток после упаривания растворяли в 100 мкл воды, часть раствора разбавляли в 100 раз и аликвоту полученного раствора, содержащую ~10 пмоль АМК-ManNAc, анализировали ВЭЖХ (колонка Ultrasphere ODS, элюция 17% водным этанолом, 0,75 мл/мин, 27°С). Выходы АМК-хитобиозы (IV) определяли по соотношению пиков АМК-ОС (IV) и АМК-ManNAc (времена удерживания относительно АМК-ManNAc 1,13 и 1,00). Максимальный выход АМК-ОС (IV) – при pH 6,2.

Влияние концентрации АМК. В серии опытов в реакцию вводились 500, 1000, 2000, 4000 и 8000 нмоль АМК, конденсацию проводили при pH 6,2. Максимальный выход АМК-ОС (IV) получен при концентрации АМК 40 нмоль/мкл (2000 нмоль в реакцию).

Влияние концентрации NaCNBH_3 . В интервале концентраций NaCNBH_3 0,2–2,0% выходы АМК-ОС (IV) практически не изменялись.

Влияние температуры прейнкубации. Прейнкубация в течение 4 ч при 40, 60 и 80°С с последующим восстановлением при 40°С практически не влияла на выход АМК-ОС (IV).

Влияние температуры на стадии восстановления. В серии опытов восстановление цианоборгидридом проводилось в течение 1 сут при 40, 60 и 80°С. Максимальный выход АМК-ОС (IV) получен при 40°С.

Оптимальные условия: pH 6,2, прейнкубация олигосахаридов с избытком 40 мМ раствора АМК в DMF — вода (1 : 1) в течение 4 ч при 40°С и восстановление большим избытком NaCNBH₃ в течение 1 сут обеспечивали выход АМК-ОС (IV) ~95%.

Получение АМК-олигосахаридов (VI). 50 мг декстрана Т500 (Fluka, Швейцария) нагревали в запаянной ампуле 30 мин при 100°С с 4 мл 0,1 М трифторуксусной кислоты в атмосфере азота [6]. Кислоту упаривали в вакууме, остаток растворяли в 3 мл DMF — вода (1 : 1), pH 6,2, добавляли 50 мг АМК, прейнкубировали и восстанавливали NaCNBH₃ при 40°С. После стандартной обработки к остатку после упаривания добавляли 20 мл воды, нерастворившийся АМК отфильтровывали, фильтрат сконцентрировали до 2 мл, выделившийся дополнительно АМК удаляли центрифугированием и полученный раствор подвергали ВЭЖХ (см. рис. 1, 2).

Гликопептиды аспалофетина. 200 мг фетина деспальировали 0,1 н. серной кислотой как описано [7]. Аспалофетин (180 мг) гидролизвали 10 мг проназы как описано [16]. Гликопептидную фракцию выделяли хроматографией на сефадексе G-25 (колонка 3×60 см, элюция 5% уксусной кислотой, анализ фракций — фенол-серная кислота [17]), повторно обрабатывали проназой и хроматографировали на биогеле Р-4 (колонка 1×100 см), элюируя водой. Гликопептидную фракцию, выходящую со свободным объемом, лиофилизвали. Содержание углеводов (ГЖХ) — 85% (по весу), соотношение галактозы, маннозы и глюкозамина 2,9 : 3,0 : 4,8.

Получение АМК-олигосахаридов (I) — (III). Гликопептидную фракцию (100 нмоль трехатомной углеводной цепи) высушивали над P₂O₅, подвергали гидразинолизу 2 мл безводного гидразина в ампуле в атмосфере азота при 100°С в течение 10 ч [18]. После удаления гидразина остаток растворяли в 5 мл воды, добавляли 1 мл бензальдегида и 0,2 мл уксусной кислоты, прогревали 15 мин при 100°С, упаривали, к остатку добавляли 3 мл воды и экстрагировали этилацетатом (3 мл×3) [8]. Водный слой упаривали, остаток растворяли в 2 мл насыщ. водн. раствора NaHCO₃, добавляли трижды по 100 мкл уксусного ангидрида с интервалом 10–15 мин, подкислявая каждый раз сухим NaHCO₃ до pH 8,0. Раствор разбавляли водой до 5 мл, подкисляли дауэсом 50×8 до pH 3,5, смолу отфильтровывали, промывали пятью объемами воды, фильтраты упаривали. Полученные олигосахариды прейнкубировали с 3 мл стандартного раствора АМК (40 мМ раствор в смеси DMF — вода, pH 6,2) и восстанавливали 20 мг NaCNBH₃ как описано выше. К остатку после удаления борной кислоты добавляли 3 мл воды, АМК удаляли центрифугированием, супернатант хроматографировали на биогеле Р-4 (колонка 2×50 см, элюция водой). Фракции АМК-ОС (первая флуоресцирующая в ультрафиолете зона) собирали и упаривали. Аликвоту фракции анализировали ВЭЖХ на Ultrasphere ODS (рис. 3а). Выход АМК-ОС (I) — (III), определенный флуориметрически, составлял 50–60% от теоретического, считая на исходные гликопептиды. Индивидуальные АМК-ОС (I) — (III) получали препаративной ВЭЖХ на Zorbax ODS. Их моносахаридный состав (см. таблицы) определяли как описано [1].

50 нмоль индивидуального АМК-ОС гидролизвали 4 н. HCl в запаянной ампуле в атмосфере азота при 100°С в течение 4–20 ч. Кислоту удаляли в вакууме, остаток ре-N-ацетилировали и анализировали ВЭЖХ на Ultrasphere ODS как описано [1]. При гидролизе в течение 4 ч обнаруживали АМК-ОС (IV), количество которого уменьшалось при увеличении времени гидролиза и который исчезал при 20-часовом гидролизе.

В аналитическом варианте методики 10 нмоль гликопептидов подвергали гидразинолизу в 50 мкл гидразина в описанных выше условиях. К остатку после удаления гидразина добавляли 29 мкл воды и 100 мкл смеси этанола — бензальдегид (7 : 1), оставляли на 30 мин при 20°С, упаривали, к остатку добавляли 100 мкл воды и обрабатывали этилацетатом (100 мкл×3) [8]. Водный раствор упаривали и ре-N-ацетилировали (двукратная обработка 4 мкл Ac₂O) в 100 мкл бикарбоната, добавляли 50 мкл уксусной кислоты и упаривали. Остаток прейнкубировали с 50 мкл стандартного раствора АМК и восстанавливали (2 мкл 0,5% NaCNBH₃ в метаноле). Остаток после удаления борной кислоты анализировали ВЭЖХ.

Ферментативный гидролиз АМК-ОС (I) — (III). Ферментализацию проводили при 37°С в присутствии толуола в 0,1 М Na-ацетатном буфере, pH 3,5 (дегалактозилрование) или pH 4,5 (обработка глюкозаминидазой). На 1–5 нмоль АМК-ОС брали 0,05 ед. акт. фермента в 100 мкл буфера, на 5–10 нмоль — 0,002 ед. акт. в 20 мкл буфера.

Для характеристики промежуточных продуктов гидролиза инкубацию проводили в течение 2 ч, при получении конечных продуктов — сутки. По окончании гидролиза инкубационную смесь прогревали 2 мин при 100°С и подвергали ВЭЖХ (см. рис. 3 и таблицу).

ЛИТЕРАТУРА

1. Хорлин А. Я., Шиян С. Д., Маркин В. А., Насонов В. В., Мирзаянова М. П. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 9. С. 1203–1212.
2. Coles E., Reinhold V. N., Carr S. A. // Carbohydr. Res. 1985. V. 139. P. 1–11.
3. Hase S., Kikuchi N., Ikenaka T., Inoue K. // J. Biochem. 1985. V. 98. № 2. P. 863–874.

4. Hase S., Koyama S., Daiyasu H., Takemoto H., Hara S., Kobayashi Y., Kyogoku Y., Ikenaka T. // J. Biochem. 1986. V. 100. № 1. P. 1-10.
5. Hase S., Sugimoto T., Takemoto H., Ikenaka T., Schmid K. // J. Biochem. 1986. V. 99. № 6. P. 1725-1733.
6. Koizumi K., Utamura T., Okada Y. // J. Chromatogr. 1985. V. 321. P. 145-157.
7. Spennerholm L. // Acta chem. scand. 1958. V. 12. P. 547-554.
8. Hase S., Ikenaka T., Matsushima Y. // J. Biochem. 1981. V. 90. № 2. P. 407-411.
9. Berman E. // Carbohydr. Res. 1986. V. 152. № 1. P. 33-46.
10. Schachter H. // Biochem. Cell. Biol. 1986. V. 64. P. 163-181.
11. Tang P. W., Williams J. M. // Carbohydr. Res. 1983. V. 121. № 1. P. 89-97.
12. Kobata A. // Anal. Biochem. 1979. V. 1. № 1. P. 1-14.
13. Takasaki S., Kobata A. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 19. P. 5709-5715.
14. Алекина Т. В., Мурзаянова М. Н., Шуляк С. Д., Хорлин А. Я. // Биохимия. 1984. Т. 49. № 1. С. 93-103.
15. Rupley J. A. // Biochim. et biophys. acta. 1964. V. 83. № 1. P. 245-255.
16. Baenziger J. U. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 3. P. 789-795.
17. Du Bois M., Gilles K. A., Hamilton Y. H., Rebers P. A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. № 3. P. 350-356.
18. Takasaki S., Mizuochi T., Kobata A. // Method. Enzymol. 1982. V. 83. P. 263-268.

Поступила в редакцию
16.I.1987
После доработки
19.II.1987

FLUORESCENT DERIVATIVES OF CARBOHYDRATES IN STRUCTURAL STUDIES OF GLYCOCONJUGATES. N-(4-METHYLCOUMARIN-7-YL) GLYCAMINES IN STUDYING ASPARAGINE-LINKED CARBOHYDRATE CHAINS OF GLYCOPROTEINS

KHORLIN A. Ya., SHIYAN S. D., NASONOV V. V., MARKIN V. A.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

4-(N-Methylcoumarin-7-yl)glycamines were employed in studying asparagine-linked carbohydrate chains of acid desialylated fetuin. The procedure was optimised for the reductive amination of oligosaccharides with 7-amino-4-methylcoumarin in the presence of $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$ to lead to oligosaccharide glycamines (AMC-OS). AMC-OS were obtained from dextran oligosaccharides and from oligosaccharides released by hydrazinolysis of asparagine-linked sugar chains of asialofetuin. Reverse-phase HPLC and exclusion HPLC with fluorimetric quantitation of AMC-OS is described. TSK Gel 2000 SW column was calibrated using dextran AMC-OS to give linear relationship $\ln N_i = k(t_i/t_r) + b$, where t_i/t_r is retention time of the AMC-OS relatively to the reference AMC-trisaccharide, and N_i is calibration unit value, characterizing molecular size of AMC-OS. Three AMC-OS, $\text{Gal}_3\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-AMC}$ (I) and (II), and $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{AMC}$ (III), were obtained from asialofetuin in a molar ration of 1:1.8:0.1. Acid treatment of AMC-OS (II) in desialylation conditions also gave AMC-OS (III), thus suggesting a partial degalactosylation of the glycoprotein sugar chains during the desialylation. Consequent digestion of AMC-OS (II) and (III) with Jack bean β -galactosidase and β -N-acetylhexosaminidase led to the same AMC-OS, $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{AMC}$. The final digestion product of AMC-OS (I) was $\text{GalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2\text{AMC}$, suggesting a structural difference in one of the antennas of the minor sugar chain of asialofetuin. The monosaccharide quantitation and exoglycosidase sequencing were carried out at a 100 pmole level.