



УДК 547.963.1.02 : 577.114.5

© 1991 г.

И. М. Дихошерстов, В. Е. Пискарев, Н. Ф. Сепетов,
В. А. Дервицкая, Н. К. Кочетков*

СТРУКТУРА УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ
РИБОФЛАВИНСВЯЗЫВАЮЩЕГО ГЛИКОПРОТЕИНА
БЕЛКА КУРИНОГО ЯЙЦА

IV *. НЕЙТРАЛЬНЫЕ ОЛИГОСАХАРИДЫ ГИБРИДНОГО ТИПА

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва;

** Научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии Всесоюзного
кардиологического центра АМН СССР, Москва*

Из рибофлавинсвязывающего гликопротеина белка куриного яйца с помощью LiBH_4 в $t\text{-BuOH}$ отщеплены олигосахаридные цепи. Методом ВЭЖХ выделены два нейтральных гибридных бисектированных олигосахарида в виде альдитолов, структура которых определена с помощью спектроскопии ^1H -ЯМР (500 МГц) и метилирования. Один из этих олигосахаридов был обнаружен ранее в овалбумине, а второй обнаружен в гликопротеинах впервые.

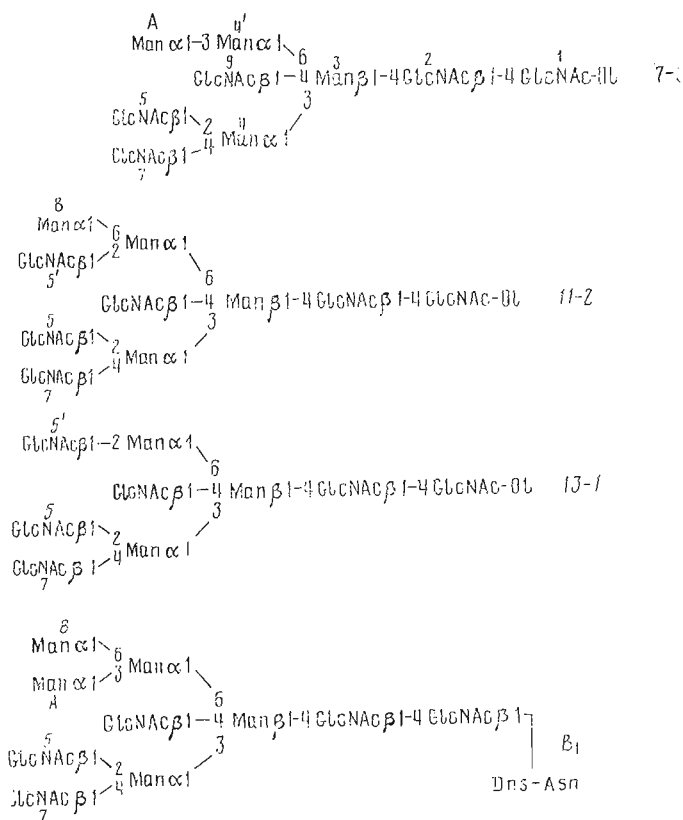
Ранее [2] нами была показана высокая гетерогенность углеводных цепей рибофлавинсвязывающего гликопротеина белка куриного яйца (РФ-ГП₆) и установлена структура фукозилированных [1] и главных нейтральных бисектированных [3] олигосахаридов. Цель данной работы — выделение и установление структуры нейтральных гибридных бисектированных олигосахаридных цепей РФ-ГП₆.

Отщепление олигосахаридных цепей от гликопротеина, их восстановление до альдитолов и разделение на кислую и нейтральную олигосахаридные фракции проводили как описано ранее [2, 3]. Нейтральную олигосахаридную фракцию разделяли с помощью ВЭЖХ. Сначала обращенно-фазовой хроматографией на колонке $\mu\text{Bondapak C-18}$ выделяли фракции 7 и 11 (рис. 1а), а затем, после повторной хроматографии этих фракций, на той же колонке проводили их дальнейшее разделение с помощью нормально-фазовой хроматографии на колонке Zorbax NH_2 в градиенте ацетонитрил — вода. При этом фракции 7 и 11 разделялись еще на ряд олигосахаридных фракций (рис. 1б, в). Моносахаридный состав полученных олигосахаридных фракций позволял предположить, что фракции 7-3 и 11-2 содержат альдитолы олигосахаридов гибридного типа. По данным спектроскопии ^1H -ЯМР (500 МГц), олигосахарид 11-2 был гомогенным, а олигосахарид 7-3 содержал ~15% примесей, которые отделялись при повторной нормально-фазовой хроматографии. Выделенным таким образом альдитолам олигосахаридов 7-3 и 11-2 на основании данных спектроскопии ^1H -ЯМР (500 МГц) и метилирования были приписаны структуры, изображенные на схеме.

Олигосахарид 7-3. По данным моносахаридного анализа, олигосахарид 7-3 имел состав $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_4\text{GlcNAc-ol}$. Его структура была определена на основании практически полного соответствия химических сдвигов протонов (таблица) в спектре ^1H -ЯМР (500 МГц) его моносахаридных остатков (кроме GlcNAc-1-ol и GlcNAc-2) с аналогичными химическими сдвигами протонов в гликоаспарагине AC-CC ($\text{Man}_4\text{GlcNAc}_5\text{Asn}$), выделенном ранее [6] из овалбумина. Значения химических сдвигов протонов структурно

* Сообщение III см. [1]. Принятые сокращения: РФ-ГП₆ — рибофлавинсвязывающий гликопротеин белка куриного яйца; Dns — дансил.

С структуры олигосахаридов 7-3, 11-2 и описанные ранее [3, 4] структуры 13-1 и В₁ (цифра или буква над или под моносахаридным остатком соответствует его обозначению в спектрах ¹H-ЯМР [5])



рецепторных групп GlcNAc-1-ol и GlcNAc-2 олигосахарида 7-3 совпадали при этом с литературными данными для структур восстановленных олигосахаридов такого типа [3, 7].

Олигосахарид 11-2. Моносахаридный состав олигосахарида (Man₄Glc₅NAcGlcNAc-ol) позволял предположить, что он имеет структуру гибридного типа. Спектр ¹H-ЯМР (500 МГц) (рис. 2) олигосахарида 11-2 имел много общего со спектрами ранее выделенных [3, 4] биссектированных олигосахаридов гибридного и комплексного типов, характерных для гликопротеинов белка куриного яйца. Структура и параметры спектров двух таких олигосахаридов (13-1 и В₁) представлены для сравнения на схеме и в таблице. Биссектированный олигосахарид 13-1 комплексного типа, обнаруженный нами ранее в РФ-ГП₆ [3], по всем параметрам спектра соответствовал олигосахариду 11-2. При этом химические сдвиги протонов дополнительного остатка Man, присутствующего в олигосахариде 11-2 (по сравнению с 13-1), полностью соответствовали остатку Man-В N^α-дансил-N⁶-гликозиласпарагина В₁, полученному из овальбумина [4]. На основании данных ¹H-ЯМР (500 МГц) олигосахариду 11-2 была приписана структура, представленная на схеме. Для ее подтверждения олигосахарид анализировали методом метилирования.

Изучение продуктов гидролиза метилированного олигосахарида 11-2 после восстановления и ацетилирования позволило идентифицировать с помощью ГЖХ ацетаты 2-О-метил-, 3,6-ди-О-метил-, 3,4-ди-О-метил- и 2,3,4,6-тетра-О-метил-маннитов в соотношении 1,10 : 1,05 : 0,95 : 1,00, а анализ продуктов гидролиза метилированного олигосахарида с помощью аминокислотного анализатора с бидинхонинатным реагентом [8] позволил идентифицировать 3,6-ди-О-метил- и 3,4,6-три-О-метил-N-метилглюкозамиды в соотношении 1 : 3,8 (метилированный N-метилглюкозаминитол в этих условиях не определяется). Эти данные подтверждают структуру, предложенную нами для олигосахарида 11-2.

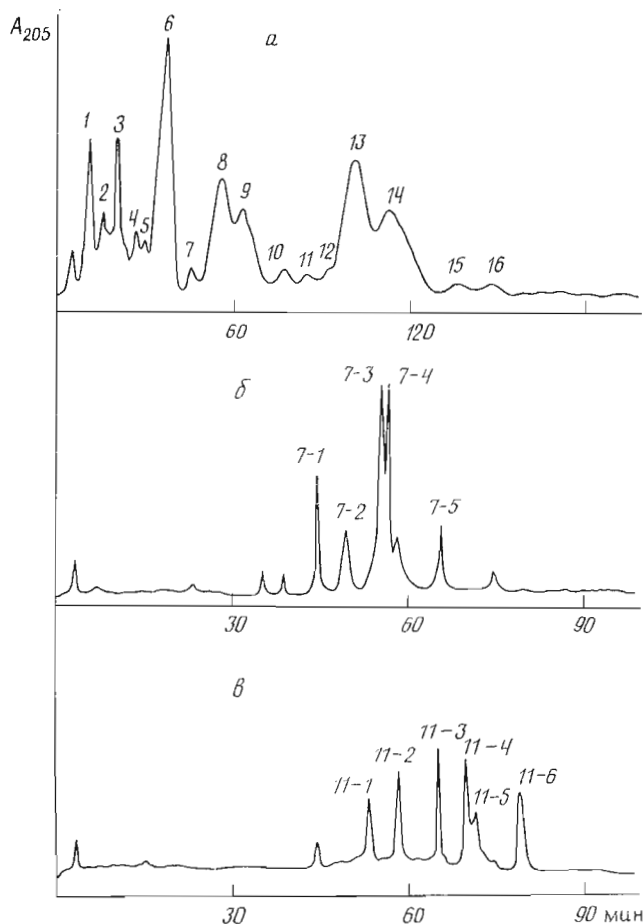


Рис. 1. Разделение смеси восстановленных олигосахаридов из РФ-ГП_б на колонке (19 × 150 мм) μ Bondapak C-18 в воде, скорость потока 6 мл/мин (а) и разделение фракций 7 (б) и 11 (в) на колонке (4,6 × 250 мм) Zorbax NH₂, элюция градиентом вода — ацетонитрил (70 → 55% ацетонитрила за 120 мин), скорость потока 1 мл/мин. Детекция при 205 нм

Таким образом, в РФ-ГП_б наряду с нейтральными комплексными бисекстированными [3] или фукозилированными [1] цепями обнаружены две гибридные углеводные цепи. И если олигосахарид 7-3 хорошо известен из работ по изучению структуры углеводных цепей овальбумина [6], то олигосахарид 11-2 в белке куриного яйца обнаружен впервые. Насколько нам известно, олигосахаридные цепи такого типа до сих пор в гликопротеинах не обнаружены, и, таким образом, олигосахарид 11-2, по-видимому, является первым представителем нового варианта гибридных цепей.

В заключение следует отметить, что наличие в РФ-ГП_б углеводной цепи, соответствующей олигосахариду 11-2, свидетельствует о том, что трансформация некоторых олигоманнозидных цепей этого гликопротеина протекает по необычной биосинтетической схеме и позволяет предположить более широкую специфичность α -1,6-маннозил-гликопротеин- β -1,2-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы II (КФ 2.4.1.143): способность этого фермента использовать в качестве субстрата не только фрагмент, содержащий три маннозных остатка, но и фрагмент, содержащий четыре маннозных остатка. В то же время одновременное выделение из РФ-ГП_б в примерно равных количествах олигосахаридов 7-3 и 11-2 свидетельствует о близких скоростях отщепления остатков Man-A и Man-B с помощью маннозидазы II, в состав которой, как известно [9], входят два соответствующих фермента.

Экспериментальная часть

Выделение РФ-ГП_б, отщепление олигосахаридов, моносахаридный анализ, ВЭЖХ и спектроскопию ¹H-ЯМР олигосахаридов проводили как описано ранее [1—3].

Для анализа ацетатов O-метилманнитов использовали газожидкостный

**Химические сдвиги (δ , м. д.) протонов структурно-репортерных групп
моносахаридных остатков углеводных цепей РФ-ГП₅**

Протон	Обозначение номера остатка моносахарида	Олигосахарид			
		7-3	11-2	13-1 [3]	B ₁ [4]
H-1	2	4,629	4,638	4,634	4,580
	3	н. о. *	4,700	4,698	4,734
	4	5,054	5,062	5,057	5,048
	4'	4,942	4,998	5,000	4,916
	5	4,515	4,552	4,539	4,516
	5'	—	4,552	4,542	—
	7	4,515	4,523	4,518	4,516
	9	4,443	4,448	4,465	4,408
	A	5,076	—	—	5,048
	B	—	4,917	—	4,923
H-2	1-ol	н. о.	4,250	4,244	н. о.
	2	3,759	3,798	н. о.	»
	3	н. о.	4,155	4,149	4,159
	4	4,293	4,282	4,285	4,288
	4'	4,161	4,147	4,146	4,158
	5	3,721	3,726	н. о.	н. о.
	5'	—	3,726	»	»
	7	3,753	3,756	3,754	»
	9	3,706	3,684	н. о.	»
	A	4,060	—	—	4,068
CH ₃ (N-Ac)	B	—	4,005	—	4,005
	1-ol	2,053	2,060 **	2,057	2,027
	2	2,061	2,085	2,077	2,065
	5	2,053	2,069 **	2,054	2,051
	5'	—	2,046	2,047	—
	7	2,082	2,088	2,082	2,082
	9	2,063	2,069	2,063	2,065

* н. о. — не определяли; ** Отнесение может быть обратным.

хроматограф Hewlett-Packard 5890A (США) с капиллярной колонкой Ultra-1 при 180—220° С (градиент 3 или 4° С/мин). Анализ О-метил-N-метилглюкозаминов проводили на анализаторе аминокислот Biotronik LC-2000 (ФРГ) с колонкой (0,4 × 25 см), наполненной Ostion LG ANB в 0,35 М натрий-цитратно-солянокислом буфере (pH 5,28) при 64° С, реагент — бицихонинат натрия [8]. Идентификация ацетатов О-метилманнитов и О-метил-N-метилглюкозаминов осуществлена сравнением со стандартными образцами, все возможные варианты которых в условиях хроматографии имели характерные, отличные друг от друга времена удерживания.

Метилирование олигосахарида 11-2 (~50 нмоль) проводили по методу [10]. Метилированный олигосахарид гидролизовали в 1 мл 2 М трифторуксусной кислоты (2 ч, 120° С). Гидролизат упаривали досуха, прибавляли воду (3 × 3 мл) и снова упаривали до pH 5—6. Остаток растворяли в 0,2 мл воды, раствор пропускали через колонку (0,25 × 3 см) с дауэксом 50W × 2, метилированные нейтральные моносахариды смывали 2,5 мл воды, а метилированные N-метил-D-глюкозамин и N-метил-D-глюкозаминитол элюировали 4,5 мл 1 М NH₄OH. Щелочной элюат собирали в колбу, охлажденную льдом, и по окончании элюции сразу же упаривали до ~1 мл, раствор подкисляли HCl до pH 2—3, упаривали досуха и в остатке идентифицировали 3,4,6-триметил- и 3,6-диметил-N-метилглюкозамин в соотношении 3,7 : 1.

Водный элюат, содержащий метилированные нейтральные моносахариды, упаривали досуха и при охлаждении льдом к остатку прибавляли 0,1—0,15 мл 0,2 М NaOH до pH > 10 и 3—5 мг NaBH₄. Раствор оставляли на 16 ч при 20° С, разбавляли водой до 0,5 мл, избыток боргидрида разлагали уксусной кислотой, раствор упаривали досуха с метанолом (3 × 3 мл), а затем с толуолом (2 × 3 мл). К сухому остатку прибавляли 0,2 мл уксусного ангидрида и нагревали 4 ч при 100° С. Реакционную массу обра-

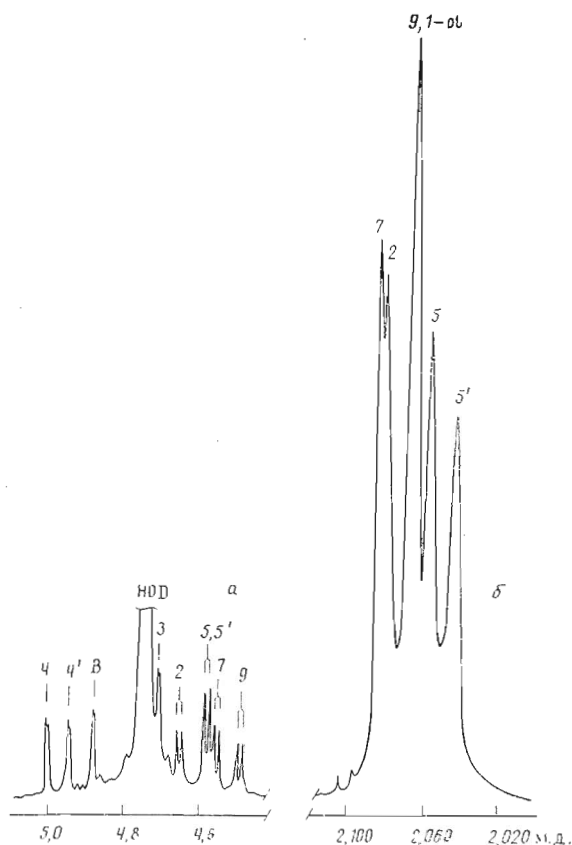


Рис. 2. Спектр ^1H -ЯМР (500 МГц, 300 К) олигосахарида 11-2 в области сигналов Н-1 моносахаридных остатков (α) и групп CH_3 (N-Ас) в остатках GlcNAc (β). Цифры и буквы соответствуют обозначениям моносахаридных остатков (см. схему)

батывали водой и метанолом (по 1 мл), оставляли на 1 ч при 20° С и раствор упаривали с метанолом (2×3 мл). Из полученного остатка метилированные ацетаты альдитолов экстрагировали хлороформом (3×1 мл) и с помощью ГЖХ идентифицировали 2,3,4,6-тетра-О-метил-1,5-диацетилманнит, 3,6-ди-О-метил-1,2,4,5-тетраацетилманнит, 3,4-ди-О-метил-1,2,5,6-тетраацетилманнит и 2-О-метил-1,3,4,5,6-пентаацетилманнит в соотношении 0,95 : 1,0 : 0,9 : 1,1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пискарев В. Е., Лихошерстов Л. М., Галенко Е. Л., Сепетов Н. Ф., Дерезицкая В. А. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 7. С. 951—955.
2. Лихошерстов Л. М., Пискарев В. Е., Галенко Е. Л., Дерезицкая В. А., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 4. С. 528—532.
3. Пискарев В. Е., Сепетов Н. Ф., Лихошерстов Л. М., Галенко Е. Л., Дерезицкая В. А., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 11. С. 1546—1554.
4. van Halbeek H., Vliegthart J. F. G., Iwase H., Li S.-C., Li Y.-T. // Glycoconjugate J. 1985. V. 2. № 3—4. P. 235—253.
5. Vliegthart J. F. G., Dorland L., van Halbeek H. // Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. 1983. V. 41. P. 209—374.
6. Ceccarini C., Lorenzoni P., Atkinson P. H. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 759. № 1. P. 214—221.
7. Paz-Parente J., Wieruszkeski J.-M., Strecker G., Montreuil J., Fournet B., van Halbeek H., Dorland L., Vliegthart J. F. G. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 22. P. 13173—13176.
8. Sinner M., Puls J. // J. Chromatogr. 1978. V. 156. № 1. P. 197—204.
9. Harpaz N., Schachter H. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 10. P. 4894—4902.
10. Cincanu I., Kerek F. // Carbohydr. Res. 1984. V. 131. № 2. P. 209—217.

Поступила в редакцию
15.V.1990

STRUCTURE OF THE OLIGOSACCHARIDE CHAINS OF
RIBOFLAVIN-BINDING GLYCOPROTEIN FROM HEN EGG WHITE.
IV. NEUTRAL OLIGOSACCHARIDES OF A HYBRID TYPE

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

**Institute of Experimental Cardiology, All-Union Cardiology Research Centre,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

Reductive cleavage of the riboflavin-binding glycoprotein from hen egg white with $\text{LiBH}_4/\text{tert-BuOH}$ followed by NaBH_4 treatment gave rise to oligosaccharide alditols. After fractionation by HPLC two individual oligosaccharide alditols of a hybrid type were isolated. Their structures were proved by ^1H NMR 500 MHz spectroscopy and methylation analysis. One of the oligosaccharides has earlier been found in ovalbumin, whereas the other is identified in glycoproteins for the first time.