



ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.152.(3.2.1 + 3.5.1*52)'135 : 577.112.853

© 1991 г.

*Е. Н. Калиберда*ФЕРМЕНТЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ УГЛЕВОДНЫХ СТРУКТУР
ГЛИКОПРОТЕИНОВ*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва*

В обзоре рассмотрены основные типы олигосахаридных цепей гликопротеинов для конкретизации специфичности гликозидаз, необходимых для их отщепления и анализа. Кратко освещены особенности химического дегликозирования. На основе обширного фактического материала рассмотрены часто применяемые экзогликозидазы, эндогликозидазы и гликопептидамазазы, проводится их классификация по механизму действия и предлагаются подходы для частичного и полного дегликозирования гликопротеинов.

Гликопротеины — это гликоконъюгаты, которые представляют собой белки с ковалентно присоединенными к ним олигосахаридными цепями (гликанами) [1—3]. Гликозилирование белков — один из наиболее важных ко- и посттрансляционных процессов. Гликопротеины содержатся в животных организмах, растениях, микроорганизмах и вирусах.

Функция олигосахаров, присоединенных к белку O-гликозильными связями (см. ниже), заключается в основном в защите белка от протеолитических ферментов [4], в поддержании особой конформации пептидной цепи гликопротеина [5—7]. O-Гликаны группоспецифических гликопротеинов играют значительную роль в определении пространственной структуры белка через углевод-углеводные взаимодействия [8]. Гликаны O-типа часто локализируются в «стратегических» доменах пептидной цепи — например, в петлевых структурах иммуноглобулинов [6]. Подобное расположение O-гликанов было отмечено в плазминогене, в его так называемых кринглах [7].

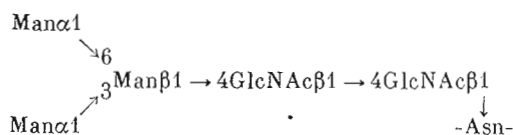
Олигосахариды, присоединенные к белку N-гликозильными связями (N-гликаны), выполняют те же функции, что и O-гликаны. N-Гликаны, кроме того, определяют такие важные процессы живой клетки, как процессинг полипептидов, катаболизм и клиренс гликопротеинов, их внутриклеточный транспорт, адгезии клеток. N-Гликаны играют роль сигнала узнавания при межклеточных и межтканевых взаимодействиях, специфичность которого зависит от структуры углеводной цепи и пептидного компонента молекулы [9]. Важная особенность N-гликанов в отличие от O-гликанов — их обязательное присутствие в мембранных белках, которые в свою очередь определяют все вышеуказанные процессы. Известно, что объемная углеводная часть гликопротеинов, интегрированных в мембрану клетки, располагаясь на внешней стороне мембраны [10], тем не менее является существенной детерминантой ориентации и конформации белков внутри мембраны [11]. Сейчас уже доказано, что N-гликаны мембранных гликопротеинов участвуют в модулировании активности клеточных мембран (например, при малигнизации клетки) [12, 13].

Функциональную роль олигосахаров в гликопротеинах определяли главным образом при исследовании анаболитических (биосинтетических) путей гликанов. Несомненно, реализация возможности получения обеих составляющих макромолекулы в изолированном виде и анализа биологических свойств позволит получить новые представления о функции олигосахаридов в гликопротеинах.

Цель данной работы заключается в том, чтобы на основании обширного фактического материала по ферментативному анализу углеводных структур гликопротеинов упорядочить ферменты по типу расщепляемых ими связей, а также обобщить имеющиеся данные по ферментам, отщепляющим олигосахариды от полипептида в гликопротеинах, и предложить подходы к использованию коммерчески доступных ферментов для изучения структуры олигосахаридов в гликопротеинах.

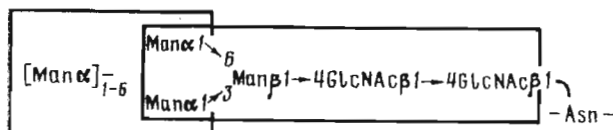
Классификация углеводных цепей гликопротеинов

Главным критерием, положенным в основу систематизации гликанов, связанных с белком, является тип связи между сахаром и белком [3, 14, 15]. Гликаны, присоединенные к аспарагиновому остатку пептидной части N-гликозиламинильной связью через остаток N-ацетил-β-D-глюкозамина, называют N-гликанами. Присоединение олигосахаридов к остаткам серина или треонина пептида O-гликозильной связью определяет другой тип — O-гликаны. Внутренняя часть гликана, непосредственно связанная с пептидом, называется кором [1, 2]. В настоящее время только для N-гликанов установлена структура постоянного кора



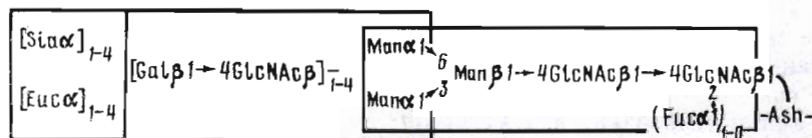
При замещении гидроксильных групп в α-маннозах кором моно-, ди- и олигосахарами образуются антенны гликана, которые во многом определяют биологическую функцию гликопротеинов [10—13, 16]. N-Гликаны делят на три группы в соответствии с видами олигосахаров, которые присоединены к пентасахаридному кору и представляют собой специфические фрагменты гликана:

1) олигоманнозидные гликаны по Ж. Монтрей [1] или маннозобогатые по С. Корнфельд [17]:



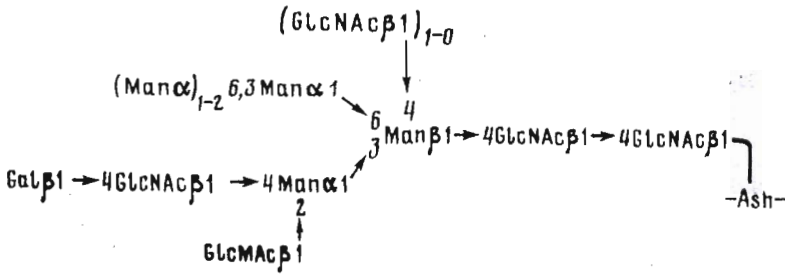
Такие гликаны обнаружены в лектине бобов, гликопротеинах клеточной стенки и овальбумине [1];

2) лактозаминные [1] или комплексные [17] гликаны:



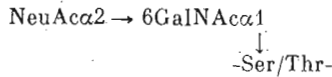
Лактозаминные гликаны представляют собой самую многочисленную группу. Они найдены в иммуноглобулинах человека и животных, фетуине, кроличьем сывороточном трансферине, плазминогене человека, лактальбумине крыс, лактотрансферине человека и т. д. [1];

3) гибридные [1] или смешанного [17] вида гликаны, выделенные из овальбумина и гликопептидов бычьего родопсина [1]:

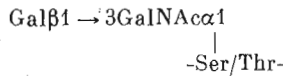


N-Гликаны в гликопротеинах организмов всех эволюционных уровней имеют одинаковый кор.

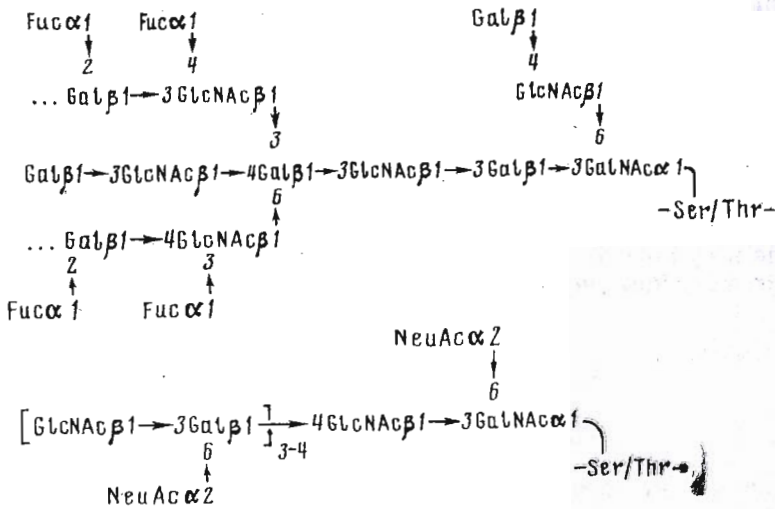
O-Гликаны не имеют постоянного кора и классифицируются в зависимости от природы углевод-белковой связи [1, 3]. Первая группа O-гликанов включает олигосахариды, присоединенные O-α-гликозильной связью через N-ацетил-D-галактозамин к серину или треонину. Остаток GalNAc в положении 6 может быть замещен NeuAc, и такие дисахаридные фрагменты впервые были найдены в муцинах слюнной жидкости, затем в гликопротеинах крови (их называют еще муциноподобными гликанами [1, 18]):



Однако замещение в GalNAc по положению 3 остатком Gal приводит к образованию фрагмента олигосахариды, наиболее распространенного в O-гликозилпротеинах [9]:

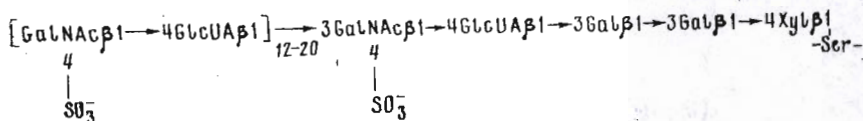


K моносахаридным остаткам этих фрагментов O-гликанов могут быть присоединены остатки NeuAc, Fuc, GlcNAc с образованием олигосахаридов, которые представлены ниже.

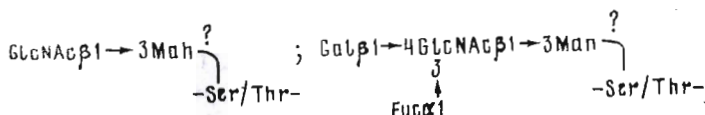


Вторая группа O-гликанов включает олигосахариды, присоединенные O-β-гликозильной связью остатка D-ксилозы к серину [1]. Все линейные углеводные полимеры этого вида составлены из дисахаридных повторяющихся звеньев, которые содержат уроновые кислоты (D-глюкуроновую или L-идуроновую) и галактозу (или N-ацетилгалактоз- или -глюкозамин). Более того, в N-ацетил-D-гексозаминах гидроксильные группы в C-4

и С-6-положениях часто сульфатированы.



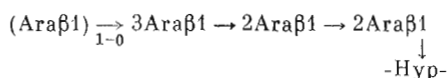
Поскольку такие гликоконъюгаты значительно отличаются от обычных гликопротеинов по структуре и физико-химическим свойствам, кислые мукополисахарид-белковые комплексы выделены в отдельную группу — протеогликаны [1, 19]. К мукополисахаридоподобным гликанам относятся и олигосахариды, присоединенные к серину или треонину ?-D-манновильной связью [20], которые были найдены в коллагенах червей [21], маннозосодержащих белках дрожжей [22], хондроитинсульфатных протеогликанах из мозга крыс [23]:



Следующая группа O-гликанов представлена соединениями, в которых остаток галактозы, присоединенный O-α-гликозильной связью к серину пептидной части гликопротеина, зачастую остается незамещенным. Такие сахара найдены в лектинах картофеля [24], экстенсинах томатов [25].

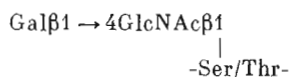
В самостоятельную группу выделены соединения, имеющие гликаны, присоединенные к L-гидроксилизину или L-гидроксипролину полипептида O-β-гликозильной связью через остаток галактозы. Углеводная часть гликопротеинов представлена либо единичным остатком галактозы, либо дисахаридом Glcα1 → 2Galβ [26]. Гликаны, присоединенные через L-гидроксилизин, впервые были найдены в тропоколлагене [27], и поэтому их еще называют коллагеноподобными. Остатки галактозы, присоединенные к L-гидроксипролину, были найдены в гликопротеинах клеточных стенок зеленых водорослей [28] и эндоспермов пшеницы [29].

Гликопротеины, имеющие O-гликаны, присоединенные к гидроксипролиновому остатку пептида через β-L-арабофуранозильный остаток [30], составляют пятую группу:



Основная часть гликопротеинов, имеющих такие гликаны, была найдена в препаратах клеточных стенок растений [31].

Недавно была открыта группа гликопротеинов, локализованных в цитоплазме и нуклеоплазме гепатоцитов крысы, которые содержат O-гликаны, присоединенные через GlcNAcβ [32]:



Химическое дегликозилирование

Возрастающий интерес к изучению гликановых частей гликопротеинов привел к развитию методов их отщепления, выделения и анализа. Эти методы в соответствии с конкретно поставленной задачей и типом гликана предполагают использование химического и/или ферментативного подходов к гидролизу углевод-пептидной связи и олигосахаридной цепи.

Химическое дегликозилирование гликопротеинов и гликопептидов может быть осуществлено для гликанов обоих типов в мягких условиях с ис-

Химическое дегликозилирование гликопротеинов

Тип гликана	Условия дегликозилирования	Интактность		Замечания	Литература
		олигосахара	пептида		
N- и O-Гликаны	F_3CSO_3H безв., $0^\circ C$, 2 ч	—	+	При отщеплении N-гликанов на Asp остается GlcNAc То же	[36]
То же	HF безв., $23^\circ C$, 3 ч	±	+		[33]
N-Гли-каны	0,2 M NaOH, 1 M $NaBH_4$, $100^\circ C$, 15—16 ч	+	—	Нет разрушения олигосахаров; меньше побочных продуктов по сравнению с гидразинолизом	[42]
То же	Гидразинолиз: H_2N-NH_2 безв., $100^\circ C$, 10 ч	+	—		[43, 47]
O-Гли-каны	$F_3CCOOH-(F_3CCO)_2O$, 1:50, $100^\circ C$, 48 ч	+	—	Отщепление O-ацетильных групп Sia, образование гидразонов и др. Количественное отщепление сахаров	[39]
То же	$CH_3COOH-(CH_3CO)_2O$, 1:1, $100^\circ C$, 48 ч	—	—		[40]
»	$CH_3COOH-(CH_3CO)_2O$, 1:1, $85^\circ C$, 200 ч	+	?	—	[40]
»	0,5 M Na_2SO_3 , 0,1 M NaOH, $25^\circ C$, 144 ч	—	—	Специфическая фрагментация олигосахаров по C-3 с сульфитированием восстанавливающегося гидроксила	[41]

Примечание. «+» — сохранение интактности; «—» — нарушение, разрушение структуры.

пользованием фтористого водорода [33] либо трифторметансульфоновой кислоты [34, 35]. Однако при этом происходит полное или частичное разрушение олигосахарида. Существует также возможность избирательного химического дегликозилирования N- и O-гликопротеинов. Действие щелочей в присутствии $NaBH_4$ по механизму β -отщепления описано [36—38] для гидролиза O-гликозильной связи (в основном в муцинах и протеогликанах) без отщепления N-гликанов; ацетоллиз [39, 40] и сульфитоллиз [41] использовались для избирательного выделения интактных O-гликанов. Следует отметить, что при определенных условиях щелочного гидролиза в присутствии $NaBH_4$, по представленным доказательствам ряда исследователей, происходит также полное или частичное отщепление N-олигосахаридов от пептидной части гликопротеинов (табл. 1) [42].

N-Олигосахариды могут быть избирательно отщеплены в условиях гидразинолиза [43—45]. Гидразинолиз проводят в относительно жестких условиях [46], при которых кроме расщепления β -N-ацетилглюкозаминильной связи с аспарагином происходит частичное отщепление O-гликанов, де-N-ацетилирование, отщепление лабильных O-ацетильных групп сиаловых кислот, образование гидразонов и других побочных продуктов реакции [47]. При химическом дегликозилировании гликопротеинов, как правило, частично или полностью разрушается белковая часть (табл. 1). Можно также отметить некоторые случаи необходимости именно химического подхода при дегликозилировании: отщепление O-гликанов в протеогликанах, — когда применение ферментов нерезультативно [38]. Однако при обработке щелочами в жестких условиях не происходит отщепления O-гликанов, присоединенных β -гликозильной связью к гидроксильную или гидроксипролину через остаток галактозы или арабинозы [15].

Ферментативное дегликозилирование

Использование ферментов, метаболизирующих сложные углеводы, позволяет во многих случаях идеально решить проблему получения белковой и углеводной частей гликопротеинов в изолированном виде. Ферменты

являются также ценным инструментом при исследованиях гликановой части гликопротеинов. Ферментативное расщепление гликозидной связи — очень мягкий и высокоспецифический метод.

В представленном обзоре все ферменты углеводного анализа разделены на два основных типа по виду расщепляемой связи, которой соединены углеводы (между собой либо с пептидом): О-гликозидгидролазы и гликопептидазы.

О-Гликозидгидролазы — ферменты, катализирующие гидролитическое расщепление О-гликозильной связи. Формально гидролиз может быть представлен как нуклеофильное замещение при аномерном центре гликоновой (отщепляемой) части субстрата, протекающее с сохранением или обращением конфигурации [48]. N-Олигосахарид—гликопептидазы катализируют гидролиз N-β-гликозиламинильной связи между N-ацетилглюкозаминном гликана и остатком аспарагина белка с образованием пептида, содержащего остаток аспарагиновой кислоты, и интермедиата — олигозиламина. Последнее производное неэнзиматически гидролизуется до олигосахарида с гликозидным гидроксилом и аммиака [49].

1. О-Гликозидгидролазы

Ферменты, катализирующие расщепление О-гликозильной связи, относят к катаболическим ферментам углеводного обмена. К настоящему времени большое количество О-гликозидгидролаз получено в индивидуальном состоянии. Специфичность действия этих ферментов определяется гликоновой (отщепляемой от невосстанавливающего конца олигосахара) и агликоновой частями субстрата. Абсолютной специфичностью О-гликозидгидролазы обладают во всех случаях лишь по отношению к двум элементам структуры субстрата: к конфигурации расщепляемой связи и к размеру окисного цикла отщепляемого углеводного остатка [50]. Особенности строения специфических субстратов и характер действия на них фермента позволяют различать два основных типа О-гликозидгидролаз: экзогликозидазы и эндогликозидазы [48].

1.1. Экзогликозидазы

Экзогликозидазы отщепляют моносахариды от невосстанавливающего конца олигосахаридов и углеводных цепей гликоконъюгатов (гликопротеинов и гликолипидов). Гликоновая специфичность экзогликозидаз во многих случаях является абсолютной. Например, α-маннозидазы (КФ 3.2.1.24) из канавалии (*jack bean*) [51] и *Aspergillus niger* [52] не отщепляют маннозу, присоединенную β-связью в коровой области N-гликана. α-Маннозидаза из канавалии расщепляет дисахариды $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ и $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}$ с одинаковой скоростью, а скорость гидролиза дисахарида $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Man}$ составляет $\frac{1}{15}$ величины скорости гидролиза двух ранее названных дисахаридов [53].

Однако некоторые экзогликозидазы проявляют более низкую специфичность относительно эпимерного центра. Так, экзогликозидазы, отщепляющие β-N-ацетилглюкозамин, отщепляют также β-N-ацетилгалактозамин, и их называют β-N-ацетилгексозаминидазами (КФ 3.2.1.52). Эти ферменты «не отличают» эпимерной конфигурации гидроксильной группы в C-4-положении двух аминокислот: N-ацетилглюкозамина и N-ацетилгалактозамина. β-N-Ацетилгексозаминидазы выделены из канавалии [51] и микроорганизмов *A. niger* [54], *Streptococcus pneumoniae* [55], *Clostridium perfringens* [56]. Подобным свойством обладает β-гликозидаза (КФ 3.2.1.21), выделенная из эмульсии мидия [50]. С одинаковой скоростью этот фермент расщепляет β-глюкозильную и β-галактозильную связи.

Агликоновая специфичность β-галактозидазы, выделенной из культуральной жидкости *S. pneumoniae* (КФ 3.2.1.23), заключается в расщеплении β-гликозильной связи в дисахариде $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$, причем этот фермент совершенно не гидролизует аналогичную связь в дисахаридном фрагменте вида $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc}$ - и $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 6\text{GlcNAc}$ - [57]. Дейст-

Виды связей, расщепление α -фукозидазами и α -сиалидазами

Фермент	КФ	Источник	Субстрат	Литература
α -Фукозидаза	3.2.1.63	<i>Bacillus fulminans</i>	Fuca1 \rightarrow 2Gal	[60]
То же	»	<i>Clostridium perfringens</i>	»	[61]
»	3.2.1.111	Эмульсия миндаля	Fuca1 \rightarrow 3GlcNAc Fuca1 \rightarrow 4GlcNAc	[62]
α -Сиалидаза (нейраминидаза)	3.2.1.18	<i>Cl. perfringens</i>	NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal (a) NeuAc α 2 \rightarrow 6Gal (b) NeuAc α 2 \rightarrow 6GlcNAc (c)	[63]
То же	»	Вирус гриппа	NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal	[64]
»	»	<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	a, b, c	[65]
»	»	<i>Vibrio cholerae</i>	a : b : c = 11 : 4 : 1 *	[66]

* Соотношение скоростей гидролиза NeuAc α 2-связи в дисахаридах a, b, c.

вие β -галактозидазы из канавалии более сложно: при низкой концентрации фермент расщепляет фрагмент Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc- в 50 раз быстрее, чем фрагмент Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc-, тогда как при больших концентрациях фермента или субстрата расщепление обеих связей проходит с одинаковой скоростью [58].

Выделенные из различных источников и изученные к настоящему времени фукозидазы обладают абсолютной специфичностью (см. табл. 2), только фукозидазы из *Turbo cornutus* и *Charonia lampas* расщепляют все известные фукозильные связи [59].

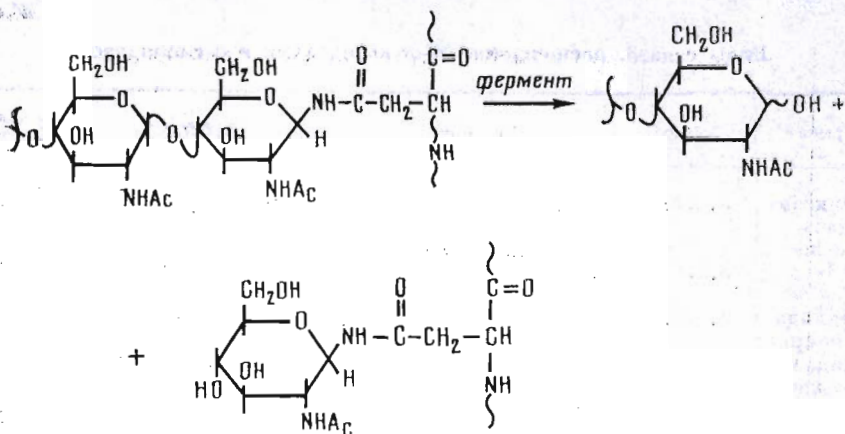
Приведенные в табл. 2 сиалидазы в отличие от фукозидаз не обладают абсолютной специфичностью, за исключением сиалидазы из вируса гриппа. Фермент, выделенный из холерного вибриона (*Vibrio cholerae*), широко используется для десиалирования гликопротеинов [40, 50].

Таким образом, используя экзогликозидазы для последовательной деградации олигосахаров с последующей идентификацией отщепляемого сахара, можно получить информацию об углеводной последовательности, включая определение аномерной конфигурации каждого отщепляемого моносахарида. Характерным свойством ряда O-гликозидгидролаз является их трансгликозилирующая активность, которую можно рассматривать как способность ферментов катализировать алкоголиз гликозидов. Это энзиматическое превращение протекает с сохранением конфигурации у аномерного центра гликоновой части субстрата практически всегда [67—69]. В настоящее время очень быстро развивается использование экзогликозидаз при значительном усовершенствовании методов их выделения и очистки для синтеза олигосахаридов [70—72]. Очень важная особенность экзогликозидаз — их способность гидролизовать олигосахариды гликопептидов и проявление «следовой» активности на гликопротеинах.

1.2. Эндогликозидазы

Субстратная специфичность эндогликозидаз определяется структурой олигосахаридов, который отщепляют эти ферменты от гликана с невозстанавливаемого конца. К настоящему времени известно значительное количество видов эндогликозидаз [73]. На действия некоторых из них необходимо остановиться подробнее вследствие их большой практической ценности.

Эндо- β -N-ацетилглюкозаминидазы (КФ 3.2.1.96) расщепляют β -O-гликозильную связь -GlcNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc-фрагмента коровой части N-гликозилированных гликопротеинов. При действии ферментов этого типа на гликопептиды и некоторые гликопротеины высвобождаются олигосахариды с N-ацетилглюкозаминем на восстанавливаемом конце и пептид с N-ацетилглюкозаминем, присоединенным к остатку аспарагина.



Ферменты подобного действия выделены из 15 источников животного, растительного и микробного происхождения. В данном обзоре рассмотрены только те ферменты, которые достаточно хорошо описаны, проверены в работе и коммерчески доступны.

Для удобства обозначения эндо-N-ацетил-β-D-глюкозаминидаз используют краткие названия, например эндо-D, эндо-F и т. д. (табл. 3). Латинская буква указывает начальную букву источника выделения этого фермента. В случае с эндо-H и эндо-L, выделенных из актиномицетов (*Streptomyces plicatus*), название ферментов произошло от специфического субстрата, расщепляемого ферментами: эндо-H расщепляет олигосахариды, имеющие не менее 5—6 моносахаров (High); действие эндо-L ограничивается расщеплением трисахарида коровой части гликана (Low). Эндо-H-фермент, выделенный из актиномицетов (*St. plicatus*) [74], расщепляет гликаны, которые не имеют фукозного остатка в коре (смешанный и маннозобогатый типы) [75, 76].

Эндо-D из стрептококка пневмонии (*S. pneumoniae*) [77] и эндо-C_I из *Cl. perfringens* [78] гидролизуют β-гликозильную связь в N,N-диацетилхитобиозе коровой части как в отсутствие, так и при наличии фукозного остатка в ней. Ферменты последнего вида проявляют активность только на субстратах, имеющих незамещенную маннозу, которая присоединена α1 → 3-связью к β-маннозе ко́ра. Эндо-C_{II} из *Cl. perfringens* подобен по специфичности эндо-H-ферменту, но имеет некоторое отличие: он гидролизует названную связь только в олигосахаридах маннозобогатого типа [78]. При использовании двух типов ферментов (эндо-D (эндо-C_I) и эндо-C_{II}) можно различить гликановые части гликопротеинов маннозобогатого и смешанного типов [79].

Практическое использование эндо-L из *St. plicatus* [80, 81] ограничено расщеплением β-гликозильной связи только в незамещенном трисахариде коровой части: Manβ₁ → 4GlcNAcβ₁ → 4GlcNAcβ₁.

В отличие от экзогликозидаз эндогликозидазы способны проявлять специфическую активность как на аспарагино-олигосахаридах и олигозил-N-ацетилглюкозаминитоле, так и на гликопротеинах, высвобождая из последних до половины общего количества олигосахаридов маннозобогатого или смешанного типов [82]. Эндо-F-фермент, выделенный из *Flavobacterium meningosepticum* [83], по специфичности подобен эндо-H и эндо-D. Преимущество эндо-F перед указанными ферментами заключается в возможности гидролизовать O-β-глюкозамидильную связь в олигосахаридах N-типа всех видов: маннозобогатых, лактозамидиновых, гибридных — присоединенных к гликопептиду или гликопротеину [84]. В работе [85] отмечалась трансгликозилирующая способность эндо-F на примере с глицерином, используемым в качестве стабилизирующего компонента в препарате фермента.

Эндо-α-N-ацетилгалактозаминидаза (гликопептид-α-N-ацетилгалактозаминидаза) (КФ 3.2.1.97) расщепляет O-гликозильную связь между N-ацетилгалактозамидом и остатком серина (треонина) (высвобождение O-гли-

Некоторые физико-химические характеристики эндогликозидаз и гликопептидамаидаз

Название фермента	Мол. масса, кДа	pH опт.	Источник	Субстрат	Литература
Эндо-β-N-ацетилглюкозаминидаза Н (эндо-Н)	29	5,5	<i>Streptomyces pilosatus</i>	$\begin{array}{c} \dots \text{M}\alpha 1 \nearrow \\ \text{}^6 \text{M}\beta 1 \longrightarrow \\ \nwarrow \text{}^3 \text{M}\alpha 1 \end{array} \downarrow \text{4GN}\beta 1 \longrightarrow \text{4GN}\beta \dots$	[74, 94]
Эндо-F	32	5,5	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	<p>Все виды N-гликанов</p> $\begin{array}{c} \dots \text{M}\alpha 1 \nearrow \\ \text{}^6 \text{M}\beta 1 \longrightarrow \\ \nwarrow \text{}^3 \text{M}\alpha 1 \end{array} \downarrow \text{4GN}\beta 1 \longrightarrow \text{4GN}\beta \dots$ <p style="text-align: center;">Fα1 ↑</p>	[84]
Эндо-C ₁	н.о.	6,5	<i>Clostridium perfringens</i>	$\begin{array}{c} \text{M}\alpha 1 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{[M}\alpha\text{]} \quad \text{M}\alpha 1 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{}^6 \text{M}\beta 1 \longrightarrow \text{}^3 \text{M}\alpha 1 \end{array} \downarrow \text{4GN}\beta 1 \longrightarrow \text{4GN}\beta$	[78]
Эндо-C ₁₁	»	7,0	»	$\begin{array}{c} \dots \text{M}\alpha 1 \nearrow \\ \text{}^6 \text{M}\beta 1 \longrightarrow \\ \nwarrow \text{}^3 \text{M}\alpha 1 \end{array} \downarrow \text{4GN}\beta 1 \longrightarrow \text{4GN}\beta \dots$	[78]
Эндо-D *	150	6,5	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	$\begin{array}{c} \text{M}\alpha 1 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{[M}\alpha\text{]} \quad \text{M}\alpha 1 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{}^6 \text{M}\beta 1 \longrightarrow \text{}^3 \text{M}\alpha 1 \end{array} \downarrow \text{4GN}\beta 1 \longrightarrow \text{4GN}\beta \dots$ <p style="text-align: center;">Fα1 ↓</p>	[77]
Эндо-J	28	5-6	jack bean	$\begin{array}{c} \text{M}\alpha 1 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{[M}\alpha\text{]} \quad \text{M}\alpha 1 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{}^6 \text{M}\beta 1 \longrightarrow \text{}^3 \text{M}\alpha 1 \end{array} \downarrow \text{4GN}\beta 1 \longrightarrow \text{4GN}\beta \dots$	[107]

Таблица 3 (продолжение)

Название фермента	Мол. масса, кДа	pH опт.	Источник	Субстрат	Литература
Эндо-L	49,5	4,0— 4,5	<i>St. plicatus</i>	Только Mβ1 → 4GNβ1 → 4GN	[80]
Эндо-β-D-галактозидаза	28	5,5— 5,8	<i>Escherichia freundii</i>	...GN (или GaN)β1 → 3Gaβ1 → 4GN... ↓	[87]
Эндо-β-D-галактозидаза (D _{II})	н.о.	6,0	<i>S. pneumoniae</i>	...GN (или Ga)β1 → 3Gaβ1 → 4GN... ↓	[91]
Эндо-β-D-галактозидаза (D _I)	»	6,0	<i>S. pneumoniae</i>	GaN (или Ga)α1 → 3Gaβ1 → 4GN... ↓ Fα1	[90, 93]
Эндо-β-D-галактозидаза	»	7,5	<i>Cl. perfringens</i>	...Gaα1 → 3Gaβ1 → 4GN... ↓	[92]
Эндо-α-N-ацетилгалактозаминидаза	160	7,6	<i>S. pneumoniae</i>	Gαβ1 → 4βGαα1 ↓ -Ser/Thr-	[86]
Гликопептидаза А	68	5,2	Эмульсия миндаля	Все N-гликаны (предварительно деснализированные)	[95]
» F	35,5	9,3	<i>Fl. meningopitiscum</i>	Все N-гликаны с превращением Asp-пептида в Asp-пептид и интактный олигосахарид	[100]
» J	48	5—6	jack bean	Все N-гликаны (предварительно деснализированные)	[107]

* В случае с *S. pneumoniae* название фермента происходит от пражного обозначения источника как Diplosoccus; п. о. — не определена; M — манноза, GN — N-ацетилгалактозамин, Ga — галактоза, GaN — ацетилгалактозамин; F — фукоза.

с три — декапептидом [96, 97]. Гликопептидамидаза из эмульсина миндаля, выделенная американскими исследователями [97], ошибочно была отнесена по классификации ферментов 1984 г. к O-гликозидгидролазам (КФ 3.2.2.18). В дополнении к номенклатуре ферментов от 1987 г. * этот фермент относят к амидогидролазам (КФ 3.5.1.52). Авторы работы [98] уточнили субстратную специфичность этого фермента относительно пептидной части: гликозилированный аспарагин должен находиться в середине пептида. По сравнению с указанным субстратом скорость отщепления олигосахарида, прикрепленного к N-концевому аспарагиновому остатку пептида, уменьшается в 3 раза. Если же гликозилированный аспарагиновый остаток находится на C-конце пептида, понижение в скорости происходит на 1—2 порядка. рН-Оптимум действия гомогенного препарата фермента из эмульсина миндаля находится в области 5—5,3, относительная молекулярная масса 68 кДа (электрофорез в ПААГ) [99].

Достаточно сложная самостоятельная задача — полное дегликозилирование гликопротеинов без изменений нативности их белковой части. Гликопептидамидаза из эмульсина миндаля полностью отщепляет N-гликаны гибридного и сложного типов (предварительно десалирированные) от белка и не отщепляет маннозобогатые гликаны. Вопрос об отщеплении N-гликана от пептидной части гликопротеинов был рассмотрен дополнительно для гликопептидазы из эмульсина миндаля [99]. Сделан вывод, что применение хаотропных солей, изменяющих структуру воды и ослабляющих гидрофобное взаимодействие, позволяет полностью дегликозилировать некоторые гликопротеины, содержащие только N-гликаны. Применение в качестве денатурирующего агента SDS полностью инактивирует этот фермент.

Фермент аналогичного действия был выделен из *Fl. meningosepticum* (КФ 3.5.1.52) [100]. Он отщепляет N-гликаны всех типов. Главное отличие гидролитической способности этого фермента от гликопептидамидогидролазы из сладкого миндаля состоит в возможности дегликозилирования нативного гликопротеина (без предварительного десалирирования). Такую особенность субстратной специфичности данного фермента авторы объясняют [84, 100] различными относительными молекулярными массами фермента из миндаля (68 кДа) и *Fl. meningosepticum* (35,5 кДа). По их мнению, пространственные препятствия для белка с большей молекулярной массой определяют меньшую доступность фермента из миндаля к сайту гидролиза. При помощи гликопептидамидогидролазы из *Fl. meningosepticum* проводят дегликозилирование нативных гликопротеинов для структурно-функционального изучения секретируемых и мембраносвязанных белков [101—103]. В данное время изучается вопрос о возможности дегликозилирования им поверхности клеток без дополнительного извлечения мембранных белков [104, 105].

Ферментный препарат из муки канавалии, богатый известными гликозидазами (см. выше), проявляет также гликопептидамидогидролазную активность [106] с рН-оптимумом действия 6,5 (табл. 3). Дополнительные исследования [107] гомогенного препарата этого фермента показали, что субстратная специфичность его весьма широка и охватывает все структуры N-гликанов (предварительно десалирированные), относительная молекулярная масса по гель-фильтрации определена в 48 кДа, отмечена способность дегликозилировать гликопротеины.

Заключение

Выбор подхода к исследованию олигосахаридной части гликопротеина определяется целью исследования. На основании рассмотренного материала первичное изучение гликана предполагает полную или частичную (на гликопептиды) деградацию белковой части гликопротеина различными протеиназами. Анализ углеводной последовательности возможен при наличии широкого набора экзо- и эндогликозидаз.

* См. Eur. J. Biochem. 1989. V. 179. P. 489—533.

Для изучения функции олигосахаридов в гликопротеине необходимо сохранить нативными белковую и гликановую части гликопротеинов при гидролизе. Для достижения этой цели в случае с N-гликанами выделен фермент из *Fl. meningosepticum* — гликопептидамидогидролаза F. Для выделения интактного N-гликана возможно также использование гликопептидиламидаз из эмульсина миндаля и муки канавалии. Для полного отщепления O-гликанов гликопротеинов применяют эндо- α -N-ацетилгалактозаминидазу из *S. pneumoniae* после предварительного десалирования либо дефукосилирования олигосахарида. Подобная предварительная обработка ферментами для отщепления терминальных сахаров необходима и для последующего применения эндо-N и эндо-D, причем эндо-N отщепляет олигосахариды маннозобогатого и гибридного типов, а эндо-D, в дополнение к этим, и гликаны сложного типа. При действии последних ферментов отщепляются N-гликаны и на аспарагиновом остатке пептидной части остается GlcNAc.

Для анализа углеводных структур без сохранения пептидной последовательности используются также указанные в этом обзоре экзогликозидазы. Применяя последовательную деградацию экзогликозидазами с учетом их специфичностей (гликоновой и агликоновой), можно выяснить не только последовательность моносахаридов гликана, но и аномерную конфигурацию каждой гликозильной связи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Montreuil J. Comprehensive Biochemistry / Ed. Neuberger A. Amsterdam: Elsevier, 1982. V. 19B. Part II. P. 1—190.
2. Хьюз Р. Гликопротеины / Ред. Габриэлян Н. Д. М.: Мир, 1985.
3. Sharon N. // Eur. J. Biochem. 1986. V. 159. № 1. P. 1—6.
4. Beely J. G. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1977. V. 76. № 4. P. 1051—1055.
5. Olden K., Pratt P. M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. № 2. P. 791—795.
6. Baenzinger J., Kornfeld S. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. № 22. P. 7260—7281.
7. Lijnen R., Hoef B., Collen D. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 120. № 1. P. 149—151.
8. Липкинд Г. М., Агапов А. Я. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 6. С. 824—835.
9. Деревицкая В. А. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 12. С. 1605—1625.
10. Hughes R. // Membrane Glycoproteins. Butterworth — London: Acad. Press, 1976.
11. Rozenberg A., Schengrund L. // Biological Role of Sialic Acid. N. Y.: Plenum, 1976.
12. Harmon R. E. // Cell Surface Carbohydrate Chemistry. N. Y.: Acad. Press, 1978.
13. Warren L., Buck C. A. // Biochim. et biophys. acta. 1978. V. 516. № 1. P. 97—127.
14. Gottshalk A., Murphy W. H., Graham E. // Nature. 1962. V. 194. № 4831. P. 1051—1056.
15. Gottshalk A. // Glycoproteins. Their Composition. Structure and Function. Amsterdam: Elsevier, 1972. P. 1—142.
16. Wolfc L., Senior R. G. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. № 6. P. 1828—1838.
17. Kornfeld R., Kornfeld S. // Annual Review of Biochem. V. 45. California: Annual Reviews, 1976. P. 217—237.
18. Tanaka K., Bertolini M. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1964. V. 16. № 2. P. 404—410.
19. Muir H. // Biochem. J. 1958. V. 69. № 1. P. 195—198.
20. Gregory J. D., Laurent T. // J. Biol. Chem. 1964. V. 239. № 10. P. 3312—3320.
21. Spiro R. G., Bhojroo V. D. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. № 18. P. 5704—5717.
22. Nakajima T., Ballou C. E. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. № 23. P. 7679—7684.
23. Finne J., Krusius T., Margolis R. K., Margolis R. U. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 20. P. 10295—10300.
24. Muray R. H., Northcote D. H. // Phytochemistry. 1978. V. 17. № 2. P. 623—629.
25. Lamport D. T. A., Katona L., Roerig S. // Biochem. J. 1973. V. 133. № 1. P. 125—131.
26. Cunningham L. W., Ford J. D. // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. № 8. P. 2390—2395.
27. Butler W. T., Cunningham L. W. // J. Biol. Chem. 1966. № 12. P. 3882—3888.
28. Miller D. H., Lamport D. T. A., Miller M. // J. Cell. Biol. 1974. V. 63. № 1. P. 420—429.
29. Fincher G. B., Sawyer W. H., Stone B. A. // Biochem. J. 1974. V. 139. № 3. P. 535—545.
30. Ashford D., Desai N. // Biochem. J. 1982. V. 201. № 1. P. 199—208.
31. Muir L., Lee Y. C. // J. Biol. Chem. 1969. V. 244. № 8. P. 2343—2349.
32. Hart G. W., Holt G. D., Haltiwanger R. S. // Trends Biomed. Sci. 1988. V. 13. № 10. P. 380—384.
33. Mort A. J., Lamport P. // Biochemistry. 1977. V. 82. № 2. P. 289—309.
34. Edge A. S., Faltynek C. R., Hoef L., Reichert L. E., Weber P. // Anal. Biochem. 1981. V. 118. № 1. P. 131—137.

35. Sojar S., Bahl O. // Arch. Biochem. and Biophys. 1987. V. 259. № 1. P. 52—57.
36. Ogata S. I., Lloyd K. O. // Anal. Biochem. 1982. V. 119. № 2. P. 351—359.
37. Кочетков Н. К., Бочков А. Ф., Дмитриев Б. А., Усов А. И., Чижев О. С., Шибанов В. Н. Химия углеводов. М.: Химия, 1967. С. 430—450, 481—489.
38. Hartley F. K., Jevons F. // Biochem. J. 1962. V. 84. № 1. P. 134—139.
39. Lindberg B., Nilsson B., Norberg T., Swensson S. // Acta chem. scand. 1979. V. 33. P. 230, 231.
40. Бовин Н. В., Хорлин А. Я. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 3. С. 420—422.
41. Edge A. S. // Carbohydr. Res. 1984. V. 126. № 2. P. 279—285.
42. Argade S. P., Daves G. D., Van Halbeek H., Alhadef J. A. // Glycoconjugate. 1989. V. 6. № 1. P. 45—56.
43. Jarnefelt J., Rush J. S. // Meth. Enzymol. 1982. V. 83. P. 311—320.
44. Matsumoto A., Yoshima H., Maeda S., Kobata A. // Arch. Biochem. and Biophys. 1982. V. 217. № 1. P. 682—695.
45. Isemura M., Schmid K. // Biochem. J. 1971. V. 124. № 3. P. 591—604.
46. Takasaki S., Mizuochi T., Kobata A. // Meth. Enzymol. 1982. V. 83. P. 263—268.
47. Bendiak B., Comming D. // Carbohydr. Res. 1986. V. 151. № 1. P. 89—103.
48. Хорлин А. Я. Структура и функции активных центров ферментов. М.: Наука, 1974. С. 39—69.
49. Ritsley J., Etten R. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 29. P. 15488—15494.
50. Kobata A. // Anal. Biochem. 1979. V. 100. № 1. P. 1—14.
51. Li Y. T., Li S.-C. // Meth. Enzymol. 1973. V. 28. P. 699.
52. Swaminathan N., Matta K. // Meth. Enzymol. 1973. V. 28. P. 744.
53. Tai T., Yamashita K., Ogata A., Kobata A. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 21. P. 8569—8575.
54. Bahl O., Agrawal K. // Meth. Enzymol. 1973. V. 28. P. 728.
55. Hugues R., Jeanloz R. // Biochemistry. 1964. V. 3. № 8. P. 1543—1547.
56. Mc Guire E., Chipowsky S., Rozeman S. // Meth. Enzymol. 1973. V. 28. P. 755.
57. Paulson J., Preads J., Glasgow L., Hill R. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 16. P. 5617—5623.
58. Arakawa M., Ogata S., Muramatsu T., Kobata A. // J. Biochem. (Tokyo). 1974. V. 75. № 3. P. 707—711.
59. Nishigaki M., Muramatsu T., Kobata A. // J. Biochem. (Tokyo). 1974. V. 74. № 2. P. 509—513.
60. Kochibe T. // J. Biochem. (Tokyo). 1973. V. 74. № 4. P. 1141—1145.
61. Aminoff D. // Meth. Enzymol. 1973. V. 28. P. 763.
62. Ogata A., Muramatsu T., Kobata A. // Arch. Biochem. and Biophys. 1977. V. 181. № 1. P. 353—356.
63. Cassidy J. T., Jourian G. W., Roseman S. // J. Biol. Chem. 1965. V. 240. № 10. P. 3501—3506.
64. Gottschalk A., Drzeniek R. // Glycoproteins / Ed. Gottschalk A. Amsterdam: Elsevier Publishing Co, 1972. P. 381—402.
65. Uchida Y., Tsukada Y., Sugimori T. // J. Biochem. (Tokyo). 1977. V. 82. № 9. P. 1425—1433.
66. Ada G. L., French E. L. // Nature. 1959. V. 183. № 4672. P. 1740, 1741.
67. Hehre E. J., Gengof D. C., Okado S. // Arch. Biochem. and Biophys. 1971. V. 142. № 2. P. 382—387.
68. Green E. D., Morishima C., Boime J., Baenziger J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 23. P. 7850—7856.
69. Tarentino A., Plummer T., Maley F. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 13. P. 4508—4511.
70. Thiem J. // Carbohydrates. Eurocarb. V Eur. Symp. Carbohydr. / Eds M. Cerny, P. Drazar. Prague, 1989. P. 6.
71. Ajsaka K., Fujimoto H. // Carbohydr. Res. 1989. V. 185. № 1. P. 139—146.
72. Nilsson K. // Carbohydr. Res. 1989. V. 188. № 1. P. 9—17.
73. Maley F., Trimble R., Tarentino A., Plummer T. // Anal. Biochem. 1989. V. 180. № 2. P. 195—204.
74. Tarentino A., Maley F. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. № 3. P. 811—917.
75. Tai T., Yamashita K. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1977. V. 78. № 1. P. 434—436.
76. Tarentino A., Maley F. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1975. V. 67. № 1. P. 455—462.
77. Koide N., Muramatsu T. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. P. 4897—4903.
78. Ito S., Muramatsu T., Kobata A. // Arch. Biochem. and Biophys. 1975. V. 171. № 1. P. 78—82.
79. Kobata A. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1977. V. 78. № 1. P. 434—437.
80. Tarentino A., Maley F. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. № 3. P. 811—817.
81. Trimble R., Tarentino A., Evans F., Maley F. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 19. P. 9705—9713.
82. Trimble T., Maley F. // Anal. Biochem. 1984. V. 141. № 2. P. 515—522.
83. Elder J., Alexander S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982. V. 79. № 15. P. 4540—4545.
84. Plummer T., Elder J., Alexander S., Tarentino A. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 17. P. 10700—10704.
85. Trimble R., Atkinson P., Plummer T. // J. Biol. Chem. 1981. V. 261. № 25. P. 12000—12007.

86. Umemoto J., Bhavandan V., Davidson V. // *J. Biol. Chem.* 1977. V. 252. № 23. P. 8609—8614.
87. Fukuda M., Muramatsu T. // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. № 20. P. 6218—6223.
88. Fukuda M., Watanabe K., Hakamori S.-T. // *J. Biol. Chem.* 1978. V. 253. № 19. P. 6814—6819.
89. Nakagawa H., Yamada T., Chien J.-L., Gargas A., Kitamikado M., Li S.-C., Li Y.-T. // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. № 13. P. 5999—5959.
90. Kobata A., Takasaki N. // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. № 10. P. 3603—3607.
91. Fukuda M. // *Biochemistry.* 1985. V. 24. № 9. P. 2154—2163.
92. Fushuku N., Muramatsu H., Uezono M., Muramatsu T. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. № 21. P. 10086—10092.
93. Fukuda M. // *Fed. Proc.* 1982. V. 41. № 4. P. 1160—1162.
94. Makino M., Yamashina J. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1966. V. 24. № 3. P. 961—963.
95. Takahashi N. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1977. V. 76. № 4. P. 1194—1197.
96. Takahashi N., Nishibe N. // *J. Biochem. (Tokyo).* 1978. V. 84. № 5. P. 1467—1471.
97. Plummer T., Tarentino A. // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. № 20. P. 10243—10248.
98. Tarentino A., Plummer T. // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. № 18. P. 10776—10781.
99. Taga E., Waheed A., Etten R. // *Biochemistry.* 1984. V. 23. № 5. P. 815—821.
100. Tarentino A., Gomez C., Plummer T. // *Biochemistry.* 1985. V. 24. № 17. P. 4665—4670.
101. Takahashi N., Ishii I. // *Biochemistry.* 1987. V. 26. № 4. P. 1137—1141.
102. Nishibe N., Takahashi N. // *Biochim. et biophys. acta.* 1981. V. 661. № 2. P. 279—281.
103. Hotta F., Ishii I., Takahashi N. // *J. Appl. Biochem.* 1985. V. 7. № 2. P. 98—101.
104. Sweidler S., Hart G., Tarentino A., Plummer T., Freed J. // *J. Biol. Chem.* 1983. V. 258. № 19. P. 11515—11520.
105. Sweidler S., Freed J., Tarentino A., Plummer T., Hart J., Hart G. // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. № 7. P. 4046—4051.
106. Sugiyama K., Ishihara N., Takahashi N. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1983. V. 112. № 1. P. 155—158.
107. Yet M. G., Wold F. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 1. P. 118—122.

Поступила в редакцию
11.II.1990

После доработки
3.XII.1990

E. N. KALIBERDA

ENZYMES IN THE GLYCOPROTEIN CARBOHYDRATE STRUCTURE STUDIES

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

Major types of oligosaccharides linked to protein and glycosidases used for carbohydrate cleavage and analysis are reviewed. Approaches to partial or complete separation of the protein and carbohydrate moieties of glycoproteins are suggested. Some data on the chemical deglycosilation are also presented.