



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Том 18 * № 4 * 1992

УДК 577.152.351'52'14

© 1992 г. Е. Н. Калиберда, В. В. Насонов, В. К. Антонов

ДЕГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ГЛИКОПЕПТИДАМИДАЗОЙ А

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва

Изучена эффективность отщепления олигосахаридов (гликанов), присоединенных N-гликозидной связью, от интактных либо денатурированных гликопротеинов гликопептидамидаизой А из сладкого миндаля. В качестве гликопротеинов-субстратов использованы D_b-фрагмент бычьего фибриногена, орозомукоид, пероксидаза хрена, овальбумин. Для дегликозилирования этим ферментом гликопротеинов, имеющих сложные N-олигосахариды, необходимо предварительно удалить терминальный остаток сиаловой кислоты. Предварительная обработка гликопротеинов хаотропными солями в восстанавливающих условиях повышает эффективность дегликозилирования гликопептидамидаизой А. Выявлена зависимость эффективности дегликозилирования гликопептидамидаизой от содержания гидрофобных аминокислот в полипептидной части гликопротеинов и расположения гликанов на полипептиде.

Гликопептидамидаиза А из сладкого миндаля (КФ 3.5.1.52) полностью отщепляет присоединенные N-гликозидной связью гликаны от остатка аспарагина пептидной части гликопептидов, превращая этот остаток в остаток аспарагиновой кислоты [1]. Названный фермент применяют для дегликозилирования гликопептидов, несущих N-гликаны всех типов: манинозобогатые, гибридные и сложные [2, 3]. Что же касается гликопротеинов, то при их обработке гликопептидамидаизой А не всегда отмечали отщепление N-гликанов. Например, авторы работы [4] не смогли осуществить дегликозилирование овальбумина и орозомукоида, содержащих манинозобогатый и сложный N-гликаны соответственно. Кроме того, противоречивые данные представлены по действию этого фермента на гликопротеины с N-олигосахаридами, содержащими в качестве терминирующих остатки сиаловых кислот [2, 4, 5]. При изучении субстратной специфичности гликопептидамидаизы А из сладкого миндаля основное внимание авторы работ [2, 4] уделяли структуре отщепляемого N-гликана, совершенно не касаясь исследования полипептидной части гликопротеина.

Цель данной работы — отработка условий дегликозилирования гликопептидамидаизой А из сладкого миндаля гликопротеинов, содержащих разные типы N-гликанов, и выяснение зависимости эффективности действия этого фермента на гликопротеины от гидрофобности его полипептидной цепи и природы N-гликанов.

В качестве гликопротеинов, содержащих N-гликаны сложного типа, были использованы D_b-фрагмент бычьего фибриногена (биантенный олигосахарид), полученный в результате плазминового гидролиза фибриногена [6], орозомукоид (α_1 -кислый гликопротеин) (би-, три- и тетраантенные олигосахариды); пример гликопротеина с N-гликаном гибридного типа — пероксидаза хрена, а с гликаном манинозобогатого типа — оваль-

Сокращения: PMSF — бензилсульфонилфторид, АМК (аминокумарин) — 7-амино-4-метилкумарин, SDS — додецилсульфат калия.

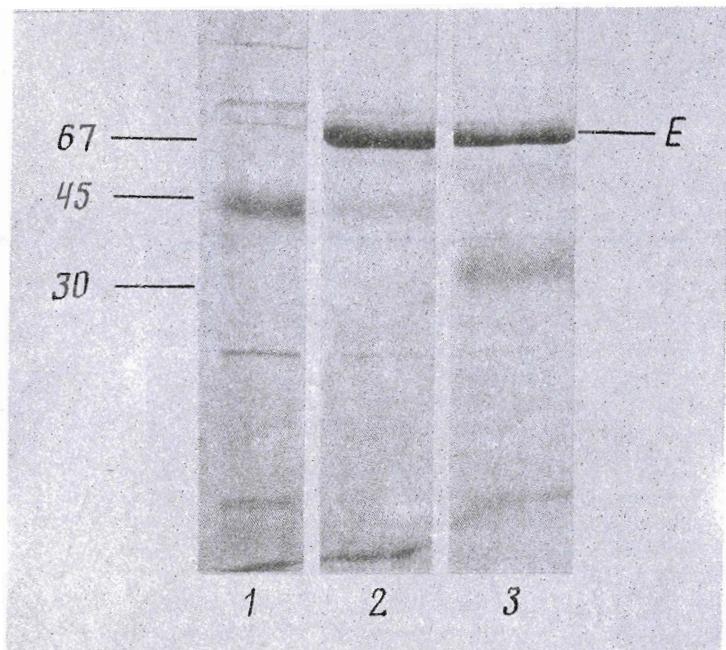


Рис. 1. Электрофорограмма в 12% ПААГ с SDS (восстанавливающие условия) белков после дегликозилирования гликопентидамида А в неденатурирующих условиях ($E-S=1:5$) орзомуконда без предварительного десиалирования (2) и десиалированного орзомуконда (3). 1 – контроль: орзомуконд (43 кДа). Здесь и далее на рисунках указано положение белков-маркеров (их мол. масса, кДа) и гликопентидамида А (68 кДа)

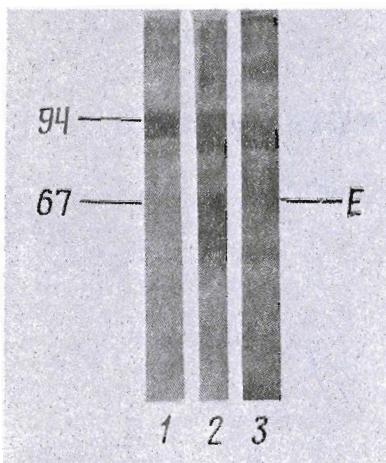
бумин. Для возможности исследования в дальнейшем биологической функции белковой части гликопротеинов * при дегликозилировании мы стремились в основном сохранить ее нативность.

Предыдущими работами [1, 2] было установлено, что оптимальными условиями для дегликозилирования гликопентидамида А из сладкого миндаля является 0,1–0,2 М Na-ацетатный буфер (pH 5,1) при 37°С в присутствии набора ингибиторов протеиназ: EDTA, PMSF, пепстатин, иодукусная кислота. Для сохранения нативности некоторых гликопротеинов, выступающих в качестве субстратов гликопентидамида А, необходимо присутствие ионов металла (например, Ca^{2+} для D_h -фрагмента фибриногена), поэтому мы исключили EDTA из реакционной смеси при дегликозилировании. Использовали ингибитор сериновых протеиназ PMSF в концентрации 3 мМ. В течение длительного времени инкубации не было отмечено следов протеолиза.

Нами было изучено влияние остатка сиаловой кислоты, которая терминирует N-олигосахариды сложного типа в гликопротеинах, на действие гликопентидамида. Дегликозилирование орзомуконда в неденатурирующих условиях отчетливо наблюдается только после удаления терминального остатка сиаловой кислоты (рис. 1). Аналогичные результаты мы получили при дегликозилировании D_h -фрагмента фибриногена: удалить гликан удавалось только после предварительного десиалирования гликопротеина нейраминидазой из вибрионов холеры (даные не приведены). Таким образом, мы установили, что предварительное десиалирование гликанов сложного типа, имеющихся в гликопротеинах,— необходимое условие последующего полного удаления N-гликанов

* Данные будут опубликованы отдельно.

Рис. 2. Электрофорограмма в 10% ПААГ с SDS (невосстанавливающие условия) после дегликозилирования десалинированного D_b-фрагмента фибриногена гликопептидамида A в неденатурирующих условиях при соотношении E-S=1:5 (2) и 1:10 (3). 1 — контроль: D_b-фрагмент фибриногена (95 кДа)



с полипептидной цепи гликопroteинов в неденатурирующих условиях инкубации. В работе [5] отщепление ферментом интактного N-гликана в Fa b_μ-фрагменте иммуноглобулина M (с терминальной сиаловой кислотой) стало возможно после преденатурации белковой части гликопroteина. В нашем случае белковая часть интактна. По-видимому, удаление сиаловой кислоты с сохранением нативности белка либо его преденатурация — «эквивалентные» условия доступности для фермента сайта расщепления. Выбор способа предварительной подготовки гликопroteина-субстрата для воздействия гликопептидамида A определяется тем, какую часть гликопroteина-субстрата необходимо иметь исследователю в интактном состоянии.

Важным фактором для эффективности дегликозилирования является соотношение фермента и субстрата в реакционной смеси. Для каждого из указанных гликопroteинов мы исследовали три различных соотношения фермент — субстрат — 1:1, 1:5, 1:10. Контроль эффективности дегликозилирования осуществляли с помощью электрофореза в ПААГ с SDS. За одно и то же время инкубации (1—1,5 сут) мы отмечали полное дегликозилирование D_b-фрагмента фибриногена при соотношении E-S 1:10 (рис. 2), оразомукоида — 1:5 (рис. 1), но вовсе не наблюдали действия фермента даже при эквимолярном соотношении фермента и субстрата для пероксидазы хрена и овальбумина (время инкубации 2 сут). При этом увеличение времени реакции при количестве фермента ниже оптимального не приводило к высвобождению гликана.

Надо отметить, что α-кислый гликопротеин (орозомукоид) и пероксидаза хрена — гликопroteины, имеющие одинаковую молекулярную массу (43 кДа) и одинаковое содержание N-гликанов, но различающиеся по типу углеводных цепей: орозомукоид — сложный тип N-гликанов, а пероксидаза хрена — гибридный тип. Очевидно, именно это различие в сочетании с большим количеством гидрофобных аминокислот в белковой части пероксидазы хрена, которое обсуждается ниже (см. табл. [7, 8]), является определяющим для неэффективности действия гликопептидамида.

Характеристика N-гликана, отщепляемого гликопептидамида A от гликопroteина, была проведена на примере D_b-фрагмента фибриногена, поскольку он имеет углеводные цепи одного типа (двуухантенный N-гликан сложного типа), эффективно удаляемые ферментом после десалинирования (рис. 2). Реакционную смесь после инкубации обрабатывали аминокумарином (AMK), как описано в «Экспериментальной части».

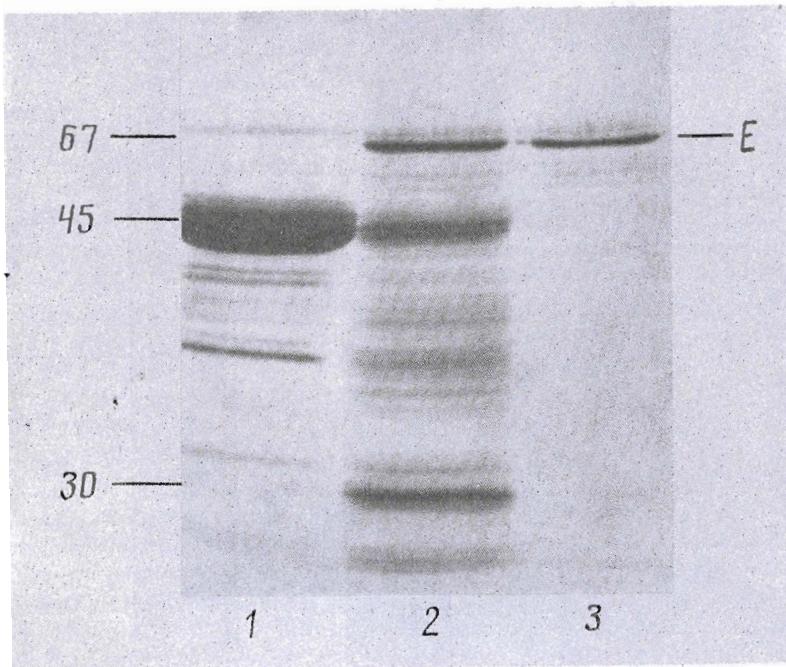


Рис. 3. Электрофорограмма в 12% ПААГ с SDS (восстанавливающие условия) белков после дегликозилирования гликопептидамида (E-S=1:1) пероксидазы хрена, денатурированной обработкой хаотропными солями в восстанавливающих условиях (2); контроль: пероксидаза хрена (43 кДа) (1) и фермент (3)

При анализе АМК-производных олигосахаридов методом ВЭЖХ на Ultrasphere ODS был обнаружен АМК-олигосахарид, совпадающий по времени выхода с АМК-производным десиалинированного двухантенного олигосахарида, полученного гидразинолизом фибриногена [9]. Этот факт свидетельствует о том, что результатом действия гликопептидамида А на десиалинированный гликопротеин является высвобождение двухантенного N-гликана.

Как отмечалось выше, мы не наблюдали отщепления этим ферментом гликанов у пероксидазы хрена и овальбумина в неденатурирующих условиях. В связи с тем что полипептидные цепи указанных гликопротеинов содержат большое количество гидрофобных аминокислот (см. таблицу из [8, 11]), мы проводили перед процедурой дегликозилирования их инкубацию с хаотропными солями в восстанавливающих условиях [4, 5]. Подобная обработка гликопротеина позволяла, помимо разрушения дисульфидных связей, экспонировать его гидрофобные участки, несущие гликаны [5]. Для пероксидазы хрена такая преднатурация способствовала дегликозилированию. Об этом свидетельствовало появление белка с молекулярной массой 30 кДа на электрофорограмме (рис. 3). Овальбумин по-прежнему не подвергался воздействию фермента (рис. 4). Надо отметить, что использование SDS в качестве денатурирующего агента при работе с гликопептидамида А невозможно ввиду полного ингибиования фермента [4].

Кроме электрофоретического контроля степень дегликозилирования гликопротеинов (D_b -фрагмент фибриногена и пероксидаза хрена) оценивалась также по содержанию углеводов в дегликозилированном белке. После диализа реакционной смеси белковую часть выделяли ВЭЖХ на

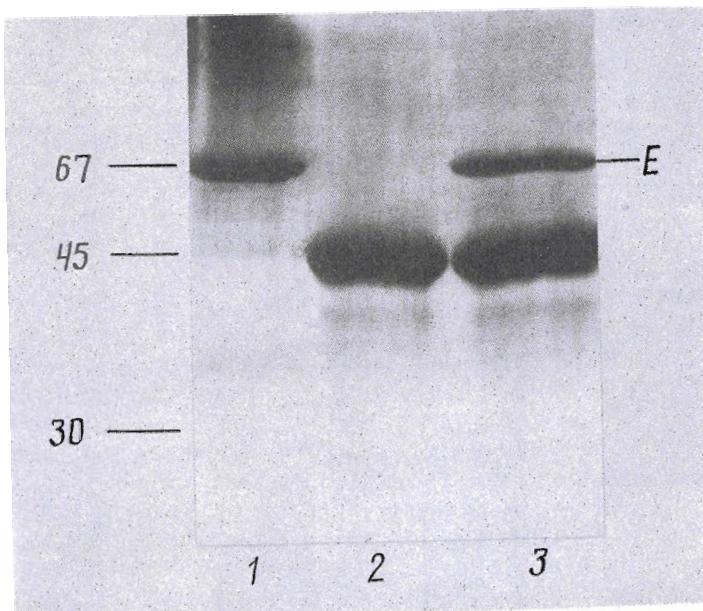


Рис. 4. Электрофореграмма в 12% ПААГ с SDS (восстановливающие условия) белков после дегликозилирования гликопептидамидаи А ($E-S=1:1$) овальбумина, денатурированного обработкой хаотропными солями в восстанавливющих условиях (3); контроль: овальбумин после преденатурации (2) и гликопептидамида А (1)

колонке TSK G 2000SW. Затем проводили кислотный гидролиз белка с последующей обработкой гидролизата аминокумарином для обнаружения и идентификации моносахаридов, возможно оставшихся после дегликозилирования ферментом. В результате этого эксперимента мы не получили АМК-моносахаридов в белковой части D_h -фрагмента фибриногена (белок с молекулярной массой 92 кДа) и пероксидазы хрена (белок с молекулярной массой 30 кДа). Тем самым мы доказали, что гликопептидамида А из сладкого миндаля полностью отщепляет в гликопротеинах десиалированные сложные и гибридные (после преденатурации гликопротеина) N-гликаны.

При рассмотрении субстратной специфичности гликопептидамидаи А на гликопептидах помимо представления обширной характеристики их N-гликанов авторы работ [1–3] отмечали особое значение пептидной части субстрата. Они указывают минимальное количество аминокислот пептида, их последовательность и расположение гликана на нем. Анализ результатов дегликозилирования гликопротеинов этим ферментом ограничивается рассмотрением типа N-гликанов, их расположением на белке. Трудность исследования участия полипептидной цепи гликопротеинов в процессе ферментативного дегликозилирования заключается в структуре, пространственной укладке белка. Поскольку на сегодняшний день не для всех используемых в этой работе гликопротеинов-субстратов имеются данные о пространственном расположении белковой части, мы рассматривали последнюю только с точки зрения анализа аминокислотного состава — гидрофобности полипептида. Следуя традиции в исследовании дегликозилирования ферментом, мы анализировали гликопротеины-субстраты по расположению гликанов на белке. Сравнивая сайты гликозилирования в гликопротеинах для единственного N-гликана β -цепи D_h -фрагмента фибриногена и овальбумина, мы отметили их C-концевое расположение: вблизи петли, образуемой цистeinами в обоих гликопротеинах.

Действие гликопентидамидазы на гликопротеины в зависимости от их белковой части в нативных условиях

Гликопротеин	Результат обработки гликопентидамидазой	Отношение количества гидрофобных аминокислот к гидрофильным
D _b -фрагмент бычьего фибриногена	+	1,13 [10]
Ороломукоид	+	1,07 [7]
Пероксидаза хрена	-	1,73 [8]
Овальбумин	-	1,67 [11]

«+» — дегликозилирование гликопротеина, «—» — отсутствие дегликозилирования гликопротеина.

тинах [10, 11]. Однако полное дегликозилирование, наблюдаемое для D_b-фрагмента фибриногена (рис. 1), вовсе отсутствовало для овальбумина (рис. 4). Указанные белки различались структурой гликана: сложный N-гликан — у фибриногена и манинзобогатый — у овальбумина. Другая пара гликопротеинов — ороломукоид и пероксидаза хрена — имеют одинаковое количество N-гликанов (20%) и равномерное расположение их на белковой глобуле. И в этом случае N-гликаны сложного типа ороломукоида аналогично гликанам D_b-фрагмента фибриногена эффективно были удалены гликопентидамидазой, тогда как при отщеплении гибридных N-гликанов пероксидазы хрена возникали трудности. При анализе аминокислотного состава указанных пар гликопротеинов-субстратов мы нашли отношение гидрофобных к гидрофильным аминокислотам для D_b-фрагмента фибриногена и овальбумина равным 1,13 и 1,67 [10, 11], для ороломукоида и пероксидазы хрена — 1,07 и 1,73 [7, 8] соответственно. Дегликозилирование этим ферментом гликопротеинов, имеющих более гидрофобную белковую часть (овальбумин и пероксидаза хрена — см. таблицу), значительно осложнено. Подтверждение нашему предположению значимости гидрофобности полипептида при ферментативном дегликозилировании мы нашли в работе [5]. Отщепление гликопентидамидазой А манинзобогатых N-гликанов рибонуклеазы В в денатурирующих условиях [5] стало возможным вследствие меньшей гидрофобности (ср. с овальбумином — таблица) полипептидной части гликопротеина. Отношение гидрофобных к гидрофильным аминокислотам по известному составу рибонуклеазы В из поджелудочной железы быка [12] нашли равным 1,14.

В результате проведенной работы по дегликозилированию гликопротеинов гликопентидамидазой А было показано, что предварительный анализ углеводного и аминокислотного состава гликопротеина-субстрата достаточно определенно отвечает на вопрос о возможности его дегликозилирования этим ферментом: 1) манинзобогатый тип N-гликана в сочетании с гидрофобной белковой частью (отношение 1,67 — см. таблицу) — нет воздействия гликопентидамидазы А ни при каких условиях. Если белковая часть гликопротеина гидрофильная (отношение 1,14), манинзобогатые N-гликаны отщепляются гликопентидамидазой после инкубации гликопротеина с хаотропными солями в восстанавливающих условиях; 2) гибридный тип N-гликана с гидрофобной белковой частью — необходима предварительная преденатурация гликопротеина с хаотропными солями в восстанавливающих условиях для последующего воздействия фермента; 3) сложный тип N-гликана с гидрофильной белковой частью — возможно эффективное отщепление десмалинированных N-гликанов этим ферментом в неденатурирующих условиях.

Экспериментальная часть

В работе использовались колонка ($7,5 \times 600$ мм) с TSK G2000SW (LKB-Bromma, Швеция), биогель P-4, 200–400 меш (Bio-Rad, США), кумасси G-250, трис, глицин, акриламид, N,N-метиленбисакриламид, TEMED, персульфат аммония, SDS, овальбумин, пероксидаза хрена, нейраминидаза из вибрионов холеры, белки-свидетели для электрофореза в ПААГ (Serva, ФРГ), хлорид кальция, изотиоцианат натрия, ацетонитрил, β -меркаптоэтанол (Merck, ФРГ), 7-амино-4-метилкумарин (Fluka, Швейцария), PMSF (Calbiochem, США), α_1 -кислый гликопротеин (орозомуконид) (Sigma, США). Очистку растворителей проводили как описано в работе [13]. D_n-фрагмент бычьего фибриногена был получен в отделе белка Института биохимии АН Украины*. Остальные реактивы были отечественного производства квалификации не ниже х. ч. ВЭЖХ АМК-олигосахаридов проводили на жидкостном хроматографе Altex 110A (США), снабженном проточным флуориметром Gilson 121 (Франция) и интегратором Shimadzu CR3A (Япония), на аналитической колонке ($4,6 \times 250$ мм) Ultrasphere ODS (Altex, США). ВЭЖХ дегликозилированных белков осуществляли на жидкостном хроматографе LKB 2150 (Швеция), снабженном проточным спектрофотометром Rapid Spectrol Photometer 2140 (LKB, Швеция). Гликопентидамидаза A из сладкого миндаля получена нами [14].

Десаливирование N-гликанов сложного типа проводили нейраминидазой из вибриона холеры (Serva, ФРГ) в 0,01 М Na-ацетатном буфере с 1 мМ CaCl₂ (pH 5,1) в течение 1–1,5 ч при 37° С. Соотношение фермент – субстрат (гликопротеин) равно 1 : 110. Останавливали реакцию замораживанием при –70° С в течение 10–15 мин.

Дегликозилирование гликопротеинов гликопентидамидазой A из сладкого миндаля осуществляли в 0,125 М ацетатном буфере с 3 мМ PMSF (pH 5,1) от 3 ч до 1–2 сут при 37° С. Количество гликопротеина-субстрата варьировало от 10 до 15 мкг. Соотношение фермент – субстрат – от 1 : 1 до 1 : 10 (все случаи обсуждаются выше).

После дегликозилирования раздельно исследовали отщепленный олигосахарид и белковую часть гликопротеинов-субстратов.

Получение АМК-меченых олигосахаридов (АМК-ОС). Часть раствора (340 пмоль олигосахаридов) после дегликозилирования кипятили и выпавший белок отделяли центрифугированием. Супернатант лиофилизовали. К лиофилизату добавляли 3 мл стандартного раствора АМК, инкубировали и восстанавливали NaBH₃CN, как описано в работе [15]. После подкисления уксусной кислотой смесь упаривали 4 раза с метанолом, сухой остаток растворяли в воде, АМК удаляли центрифугированием. Полученные АМК-ОС обессоливали на биогеле P-4 ($1,5 \times 10$ см), раствор лиофилизовали. Остаток растворяли в 300 мкл воды и аликвоту (30 мкл) анализировали на ODS Ultrasphere ($4,6 \times 250$ мм) в 12% ацетонитриле при скорости элюции 0,9 мл/мин. Детекцию осуществляли флуориметрически ($\lambda_{\text{воз}}=365$ нм; $\lambda_{\text{исп}}=440$ нм). Выход АМК-олигосахарида D_n-фрагмента фибриногена, определенный флуориметрически, составил 60% от теоретического (расчет на исходное содержание углеводов в этом гликопротеине). АМК-ОС, полученный таким образом, по времени удерживания, равном 17,52 мин, был идентичен АМК-производному десаливированного двухантенного, сложного типа N-гликана D_n-фрагмента фибриногена, полученного гидразинолизом [9].

* Мы благодарим С. В. Литвиновича и Л. В. Медведя за предоставленные препараты.

Анализ белковой части гликопroteинов после дегликозилирования. Реакционную смесь разделяли ВЭЖХ на TSK G 2000SW (7,5×600 мм) в 0,125 М фосфатном буфере с 0,2 М NaCl (рН 7,5). Контроль хроматографического разделения осуществляли спектрофотометрически при 280 нм. Белковую фракцию лиофилизовали и после кислотного гидролиза обрабатывали аминокумарином, затем методом ВЭЖХ осуществляли анализ на присутствие АМК-моносахаридов, как описано в работе [13]. АМК-моносахариды в кислотном гидролизате белка не обнаружены.

Денатурация перед дегликозилированием гликопептидамида A овальбумина и пероксидазы хрена была проведена в 0,8 М NaSCN с 0,1 М β-меркаптоэтанолом в течение 5–6 ч при 37° С [5].

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) осуществляли в 12,5% ПААГ в восстановливающих условиях по методу Лэммли [16] для всех гликопroteинов, кроме D_h-фрагмента фибриногена. Обнаружение веществ после электрофореза в ПААГ проводили кумасси. Для D_h-фрагмента был использован 10% разделяющий гель и невосстановляющие условия. Белки-свидетели для каждой электрофореграммы указаны на рисунках. Расчет молекулярной массы полученного после дегликозилирования белка проводили стандартным методом по относительной подвижности исследуемого белка с использованием калибровочного графика для белков-свидетелей в координатах молекулярная масса – относительная подвижность, причем для каждой электрофореграммы был построен собственный график.

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд, используя реагенты фирмы Bio-Rad (США) [17].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takahashi N. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1977. V. 76. № 4. P. 1194–1201.
2. Takahashi N., Nishibe N. // Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 657. № 2. P. 457–467.
3. Plummer T., Tarentino A. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 20. P. 10243–10246.
4. Taga E., Waheed A., Van Etten R. // Biochemistry. 1984. V. 23. № 5. P. 815–822.
5. Tarentino A., Plummer T. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 18. P. 10776–10780.
6. Moseson M., Galanakis P., Finlayson J. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. № 14. P. 4656–4664.
7. Schmid K., Kaufmann H., Isemura S., Bauer F., Emura J., Motoyama T., Ishiguro M., Nanno S. // Biochemistry. 1973. V. 12. № 14. P. 2711–2724.
8. Welinder K. // FEBS Lett. 1976. V. 72. № 1. P. 19–23.
9. Шиян С. Д., Насонов В. В., Маркин В. А., Белянчиков И. М. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 9. С. 1197–1207.
10. Chung D., Rixon M., McGillivray R., Davie E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 3. P. 1466–1470.
11. McReynolds L., O'Maley B., Nisbet A., Fothergill J., Givol D., Fields S., Robertson M., Brownlee G. // Nature. 1978. V. 273. № 5665. P. 723–728.
12. Rabinovitch M., Dohi S. R. // Arch. Biochem. and Biophys. 1957. V. 70. № 1. P. 239–247.
13. Хорлин А. Я., Шиян С. Д., Маркин В. А., Насонов В. В., Мирзаянова М. Н. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 9. С. 1203–1212.
14. Калиберда Е. Н., Шемякин В. В., Антонов В. К. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 6. С. 751–758.
15. Хорлин А. Я., Шиян С. Д., Насонов В. В., Маркин В. А. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1266–1274.
16. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
17. Bradford M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1/2. P. 248–254.

Поступила в редакцию
1.VII.1991

После доработки
25.X.1991

E. N. KALIBERDA, V. V. NASONOV, V. K. ANTONOV

**DEGLYCOSYLATION OF GLYCOPROTEINS WITH
GLYCOPEPTIDAMIDASE A**

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

Efficiency of the releasing of N-oligosaccharides from intact or denatured glycoproteins by the sweet almond glycopeptidamidase A has been studied with D_b-fragment of fibrinogen, orosomucoid, horse radish peroxidase, ovalbumin as substrates. Preliminary elimination of sialic acid is necessary to deglycosylate, with this enzyme, glycoproteins having complex N-oligosaccharides. A preincubation of the glycoproteins with chaotropic salts in reducing conditions increases the efficiency of the deglycosylation. An interrelation between the hydrophobic amino acids content in the glycoprotein and the N-glycan localization at the polypeptide chain, on one hand, and the deglycosylating efficiency with glycopeptidamidase A, on the other hand, had been revealed.