



УДК 577.112.853.088.3:577.152.32'14

ДЕГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ ГЛИКОПРОТЕИНОВ

© 1998 г. А. А. Виноградов[#], И. А. ЯмсковИнститут элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН,
117813, Москва, ул. Вавилова, 28

Поступила в редакцию 18.03.97 г. Принята к печати 24.02.98 г.

Рассмотрен набор методов дегликозилирования, доступных в настоящее время, возможности их применения для решения определенных задач по выяснению структуры гликопротеинов и ее связи с биологической функцией, и по созданию аналитических систем, применяемых в клинической практике. Для некоторых распространенных случаев, имеющих место в исследовательской практике, обсуждается выбор наиболее оптимальной методики дегликозилирования. Кратко описаны современные представления о первичной структуре гликопротеинов.

Ключевые слова: гликопротеины; дегликозилирование; олигосахариды; полипептиды.

ВВЕДЕНИЕ

Гликопротеинами называют соединения, содержащие углевод (гликан) ковалентно присоединенный к полипептидной цепи [1]. Это чрезвычайно широко распространенные в природе соединения: их можно встретить в тканях животных организмов, в растениях, микроорганизмах. Они играют важную роль в процессах биологического узнавания и развития, биорегуляции, транспорте, иммунологических процессах, а также входят в состав внеклеточного матрикса. Многие ферменты тоже являются гликопротеинами.

Протеогликаны – это подкласс гликопротеинов, у которых углеводные компоненты представляют собой длинные неразветвленные полисахаридные цепи, содержащие аминсахара и урановые кислоты (часто сульфатированные). Такие полисахариды принадлежат к классу гликозаминогликанов, в среднем их молекулярная масса равна 20 кДа. К полипептидной цепи (с молекулярной массой 20–250 кДа) ковалентно крепятся обычно несколько десятков гликозаминогликанов.

Определение первичной структуры гликопротеина, включающее в себя анализ аминокислотной последовательности белковой части, определение сайтов гликозилирования, структуры углевода и его микрогетерогенности на каждом из сайтов, практически невозможно провести с интактным гликопротеином [1, 2]. Значение дегликозилирования как инструмента биохимического исследования для этих и многих других задач

трудно переоценить. В большинстве случаев, в зависимости от цели исследования, приходится жертвовать либо интактностью углеводной части для исследования белковой, либо наоборот [3], хотя использование некоторых ферментов в ряде случаев позволяет одновременно выделить обе составляющие в неизменном виде.

Так как рассмотрению методов исследования олигосахаридов посвящено значительное количество работ, в данном обзоре такие методы упоминаются лишь в кратком изложении.

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА
ГЛИКОПРОТЕИНОВ

Гликопротеины входят в состав клеточных мембран, секретов, внеклеточного матрикса и соединительной ткани, присутствуют как минорные компоненты в плазме [4]. Углеводная часть может быть представлена моносахаридом, дисахаридом, олигосахаридом, полисахаридом или их производным (сульфо- или фосфозамещенным). На одной полипептидной цепи может присутствовать один, несколько или много углеводных заместителей. Различают *N*- и *O*-гликопротеины. Префикс *N*- подразумевает *N*-гликозильную связь между углеводом и остатком аспарагина. Префикс *O*- используется для обозначения *O*-гликозильной связи с остатками серина, треонина, гидроксизина или гидроксипролина. Присутствие в одном белке связей обоих типов обозначается комбинированием префиксов. Более подробно с номенклатурой гликоконъюгатов, олигосахаридов и моносахаридов можно ознакомиться по работам [5, 6].

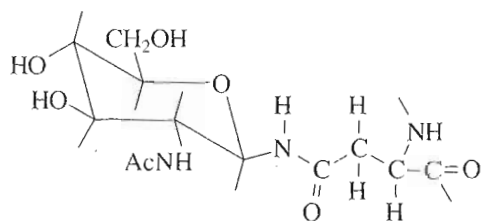
Долгое время классическими моносахаридами, входящими в состав гликопротеинов, считали *D*-

Сокращения: Ну1 – гидроксизин; Нур – гидроксипролин.

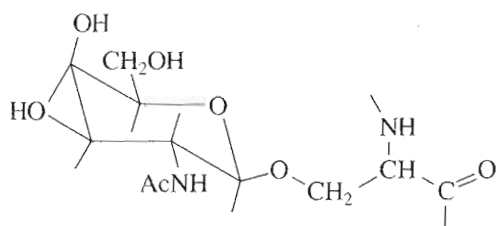
[#] Автор для переписки (тел./факс: 135-50-37).

маннозу, *D*-галактозу, *D*-глюкозу, *L*-фукозу, *D*-ксилозу, *L*-арабинофуранозу, *N*-ацетил-*D*-глюкозамин, *N*-ацетил-*D*-галактозамин и некоторые сиаловые кислоты. Однако прогресс аналитических методов в последнее время позволил обнаружить и характеризовать ряд сахаров, ранее считавшихся редкими (см. табл. 1) [8].

Как было сказано выше, гликаны могут крепиться к полипептидной цепи с помощью связей двух типов: *N*-гликозидной и *O*-гликозидной. Наиболее широко распространенные узлы связи – между *N*-ацетилглюкозамин и остатком аспарагина у *N*-гликанов и между *N*-ацетилгалактозамин и остатком серина у *O*-гликанов – изображены ниже.



*N*⁴-(*N*-ацетилглюкозаминил)аспарагин



O-(*N*-ацетилгалактозаминил)серин

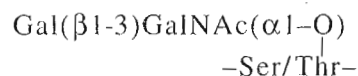
На настоящий момент [9] в гликопротеинах находят 16 различных видов гликозильных углевод-белковых связей (см. табл. 2).

В 1974 г. было замечено, что все *N*-гликозил-протеины содержат одинаковый структурный элемент, присоединенный к остатку аспарагина – маннотриозил-*N,N'*-ди-ацетилхитобиоза [10]. С тех пор этот общий и инвариантный элемент для всех *N*-гликозилированных протеинов называют кором. Эта концепция до сих пор не потеряла актуальность, хотя стало известно [8], что в бактериальных гликопротеинах существуют и другие типы гликозил-белковых связей: между аспарагином и глюкозой, *N*-ацетилгалактозамин и *L*-рамнозой (см. табл. 2).

Позднее выяснилось, что все многообразие природных *N*-гликанов получается в результате процессинга одного и того же 14-звенного олигосахарида, состоящего из *N*-ацетилглюкозамина, маннозы и глюкозы. Присоединение такого олигосахарида-предшественника происходит во время или сразу после переноса белка в полость эндоплазматического ретикула [4]. Сигнальным

пептидом для *N*-гликозилирования служит последовательность Asn-aa-Ser/Thr (где aa – любая аминокислота, кроме пролина). Дальнейшая модификация олигосахарида происходит в аппарате Гольджи. Олигосахарида маннозобогатого типа получают в результате отщепления лишних моносахаридов от олигосахарида-предшественника. Новые сахара к олигосахаридам маннозобогатого типа не добавляются. В результате такие олигосахарида могут содержать до девяти остатков маннозы и два остатка *N*-ацетилглюкозамина (табл. 3). Гибридные и комплексные, а также ксилосодержащие олигосахарида получают в результате дальнейших модификаций предшественника. К маннозным остаткам кора добавляются трисахаридные антенны, состоящие из *N*-ацетилглюкозамина, галактозы и сиаловой кислоты. Впрочем, иногда антенна представляет собой дисахарид (*N*-ацетилглюкозаминилгалактоза) или даже один *N*-ацетилглюкозамин. В зависимости от количества антенн, присоединенных к маннозным остаткам кора, различают двух-, трех- или четырехантенные комплексные олигосахарида.

Сборка *O*-гликанов происходит в аппарате Гольджи путем последовательного присоединения моносахаридов. В *O*-гликанах в отличие от *N*-гликанов различают, как минимум, шесть типов кора, присоединенных к полипептиду через остаток GalNAc. Таким образом, и у этого класса веществ можно при желании заметить определенное соответствие концепции “антенна-кор” [1]. В рамках данного обзора не представляется целесообразным освещать этот вопрос в подробностях, но будет уместно сказать, что наиболее распространенным в *O*-гликанах является кор, состоящий из остатков Gal и GalNAc [11]:



Кроме упомянутого типа встречаются олигосахарида, присоединенные к остаткам серина, треонина, гидроксипролина или тирозина полипептида через *N*-ацетилглюкозамин, маннозу, *L*-фукозу, ксилозу, галактозу, глюкозу или *L*-арабинофуранозу (см. табл. 2). Недавно был открыт новый тип связи между углеводом и белком, получаемый посредством *C*-гликозилирования триптофанового остатка в человеческой РНКазе U_s [12]. Для более детального ознакомления с природой углевод-белковой связи можно рекомендовать обзоры [8, 9, 13].

По сравнению с белками, ДНК и РНК, которые синтезируются по матричному принципу путем многократного повторения одинаковых этапов с использованием одного и того же фермента (или ферментов), механизмы синтеза олигосахарида очень сложны. Принимая это во внимание, можно объяснить тот факт, что гликопротеинам

Таблица 1. Моносахариды, найденные в гликопротеинах за последние годы [7]

Моносахариды	Источники
2-Ацетамидо-4-амино-2,4,6-тридезоксиглюкоза	<i>Clostridium symbiosum</i>
6-Дезоксиальтроза	Икра лососевых
3-Дезокси-D-глицеро-галакто-нонулозоновая кислота	»
2,3-Диацетамидо-2,3-дидезоксиманнурононовая кислота	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
2-O-Метилфукоза	Нематоды
Галактофураноза	Бактерия, трипаносома
3-O-Метилгалактоза	Дрожжи
	Улитка
	Нематоды
4-O-Метилгалактоза	Морская водоросль
6-O-Метилгалактоза	Тироглобулин
Галактоза-3-сульфат	Муцины кистозного фиброза
	Гормоны гипофиза
N-Ацетилгалактозамин-4-сульфат	Гликопротеин Тамма – Хорсфала
	Урокиназа
3-O-Метилглюкоза	<i>Methanothermophilus fervidus</i>
3-O-Метил-N-ацетилглюкозамин	<i>Clostridium thermocellum</i>
N-Ацетилглюкозамин-6-сульфат	Тироглобулин
Гулоза	Морская водоросль
3-O-Метилманноза	Улитка
Манноза-4-сульфат	Овальбумин
Манноза-6-сульфат	»
	Слизистая плесень
	»
Манноза-6-фосфат	<i>Clostridium symbiosum</i>
N-Ацетилманнозамин	Ласточкино гнездо
4,8-Ангидронейраминовая кислота	Морская звезда
8-O-Метил-9-O-ацетил-N-гликолилнейраминовая кислота	»
8-O-Метил-7,9-ди-O-ацетил-N-гликолилнейраминовая кислота	»

свойственна особая форма полиморфизма – микрогетерогенность гликанов. Другими словами, на одном и том же сайте гликозилирования могут находиться олигосахариды, отличающиеся по числу и положению периферийных сахаров. Например, кислый гликопротеин α_1 из сыворотки крови человека содержит пять сайтов гликозилирования, на каждом из которых присутствуют двух-, трех- и четырехантенные олигосахариды комплексного типа.

ОБЩИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДОВ ДЕГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ

Все методы дегликозилирования обычно подразделяют на химические и ферментативные. Основные достоинства ферментативных методов – это более мягкие условия и отсутствие неспеци-

фических побочных реакций. В то же время из-за особенностей механизма ферментативных реакций, в частности из-за стерических затруднений, далеко не во всех случаях применение таких методов позволяет достичь высокого выхода желаемых продуктов. Следует также учитывать микрогетерогенность гликопротеинов по углеводной части. Поэтому существует ограниченное количество ферментов, обладающих достаточно широкой специфичностью и способностью количественно отщеплять гликан.

Применение химического дегликозилирования не позволяет в один прием выделить в интактном виде обе составляющие гликопротеина или гликопептида. Большинство методов пригодны для получения интактных олигосахаридов, но ведут к полной или частичной деградации пептида. И лишь один из химических методов деглико-

N-дегликозилирования в системе ремодификации белков [20].

Наиболее широко для отщепления *N*-связанных олигосахаридов от гликопротеинов применяется ПНГаза F из *F. meningosepticum*. Другим широко известным ферментом из этой группы является ПНГаза A из сладкого миндаля (*sweet almond*) [18]. ПНГаза A в основном применяется для дегликозилирования гликопептидов. Ферменты аналогичного действия и специфичности были выделены из гороха (ПНГаза P из *Pisum sativum*) [22], канавалии (*jack bean*) [17], печени человека [23] и фибробластов мышей [20].

ПНГаза A имеет молекулярную массу около 80 кДа [24] (по другим данным, около 70 кДа [18]) и обладает широкой субстратной специфичностью по структуре олигосахаридов. Фермент способен отщеплять гликаны всех типов, в том числе фукозилированные, резистентные к действию ПНГазы F. Тем не менее скорости отщепления гликанов различных классов могут сильно различаться. Особенно велико это различие, если субстратом служит гликопротеин, а не гликопептид [19]. При условиях, используемых для расщепления гликопептидов, большинство гликопротеинов в реакцию не вступает. Низкую эффективность ПНГазы A в отношении крупных гликопептидов и гликопротеинов обычно объясняют стерическими затруднениями вследствие объемистой третичной структуры фермента. В работе [25] замечено, что конформация макромолекулы – основной фактор, влияющий на отщепление олигосахаридов. Чтобы преодолеть стерические затруднения, субстрат денатурируют с помощью различных детергентов или хаотропных солей. При этом скорость реакции дегликозилирования, как правило, увеличивается по меньшей мере в десятки раз, хотя существуют объекты, не подверженные действию ПНГазы A даже после воздействия денатурирующих условий.

ПНГаза A обладает сложной агликоновой специфичностью. Было показано, что на скорость расщепления гликопептидного субстрата могут оказывать влияние аминокислоты, удаленные на 5–7 остатков от сайта гликозилирования. Если олигосахарид связан с *N*- или *C*-концевым аспарагином пептидной части, скорость расщепления такой связи близка к нулю [26]. Вообще для ПНГаз наиболее предпочтительным субстратом является гликопептид, имеющий два–три аминокислотных остатка со стороны *C*- и *N*-концов аспарагина, связанного с олигосахаридом. Быстрее других отщепляются трехантенные олигосахариды комплексного типа, медленнее других – маннозобогатые цепи [22]. ПНГаза A стабильна в присутствии умеренных концентраций таких денатурантов, как NaSCN, Triton X-100, Tween 80, NP-40, мочевины, гуанидингидрохлорид,

Таблица 2. Типичные примеры углевод-белковых связей в гликопротеинах [1]

Тип гликопротеина	Аминокислота	Моносахарид
<i>N</i> -Гликозилпротеины		
Эукариоты	Asn	β -GlcNAc
Бактериальные	Asn	β -GalNAc
»	Asn	α/β -Glc
»	Asn	<i>L</i> -Rha
<i>O</i> -Гликозилпротеины		
Муцины	Ser/Thr	α -GalNAc
Внутриклеточные	Ser/Thr	β -GlcNAc
Дрожжевые	Ser/Thr	α -Man
Из тканей крысы	Ser/Thr	α - <i>L</i> -Fuc
Протеогликаны	Ser	β -Xyl
Коллагены червей	Ser	α -Gal
Тип фактора IX	Ser	β -Glc
Коллагены	Hyl	β -Gal
Экстенсины	Hyp	β - <i>L</i> -Araf
Алгалы	Hyp	β -Gal
Гликогенины	Tyr	α -Glc
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i> *	Tyr	β -Glc

* Из кристаллического поверхностного слоя (S-слоя).

рид, додецилтриметиламмоний бромид, но в присутствии 0.01% SDS (додецилсульфат натрия) сохраняет лишь 20% активности [27]. ПНГаза из черных бобов, так же как бактериальная ПНГаза P, по своим свойствам мало отличается от ПНГазы A [17].

ПНГаза F способна отщеплять *N*-связанные олигосахариды всех классов, но неэффективна для отщепления фукозилированных ксилозосодержащих олигосахаридов [28]. В этом случае следует сначала удалить остаток фукозы с помощью мягкого кислотного гидролиза, либо с помощью соответствующей фукозидазы. В то же время именно эта особенность ферментативного действия может служить полезным экспериментальным инструментом. Субстратная специфичность ПНГазы F к структуре пептидной части сходна со специфичностью ПНГазы A [29], т.е. проведение реакции затруднено, если остаток аспарагина, связанный с олигосахаридом, является концевым. ПНГаза F имеет меньшую по сравнению с ПНГазой A молекулярную массу (35.5 кДа), и это позволяет в ряде случаев проводить отщепление олигосахаридных цепей от интактных гли-

Таблица 3. Примеры *N*-связанных углеводных цепей четырех типов

Тип	Структура
Олигоманнозидный (маннозобогатый)	$\begin{array}{c} \text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \\ \text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\alpha 1-6) \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc} \\ \text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Neu5Ac}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6) \\ \text{Neu5Ac}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc} \end{array}$
Комплексный	$\begin{array}{c} \text{Neu5Ac}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Neu5Ac}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4) \\ \text{Fuc}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \\ \text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\alpha 1-6) \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc} \end{array}$
Гибридный	$\begin{array}{c} \text{Neu5Ac}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\alpha 1-6) \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc} \end{array}$
Ксилосодержащий	$\begin{array}{c} \text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc} \\ \text{Xyl}(\beta 1-2) \\ \text{Fuc}(\alpha 1-3) \end{array}$

копротеинов [30]. Однако большинство исследователей при применении ПНГазы F, как и ПНГазы A, предварительно денатурирует субстрат различными детергентами, чаще всего SDS, так как скорость реакции при этом возрастает почти в 1000 раз, а необходимое для проведения реакции количество фермента многократно снижается [31]. ПНГаза F сохраняет активность в присутствии 2–5 М мочевины, 0,25 М NaSCN, хелатирующих агентов (EDTA), многих ПАВ и ингибиторов протеиназ [27].

На примере маннозобогатых цепей рибонуклеазы B и инвертазы печени установлено, что скорость реакции, катализируемой ПНГазой F, зависит от длины углеводной цепи субстрата [30]. С уменьшением длины олигосахарида его резистентность к действию фермента увеличивается. Оказалось, что углеводная цепь, состоящая из единственного остатка GlcNAc, в результате реакции не отщепляется, а углеводный фрагмент (GlcNAc)₂ был выделен только после термоденатурации. Правда, при действии на гликопептиды, полученные из указанных выше гликопротеинов и аналогичным образом содержащие олигосахариды различной длины, во всех случаях наблюдалось практически полное расщепление.

Время проведения ферментативного дегликозилирования для разных ПНГаз по классическим методикам обычно превышает 24 ч, что подразумевает многократное добавление свежих порций

фермента и, следовательно, резкое удорожание эксперимента. Авторы работы [32] на примере наиболее практически важной ПНГазы F показали, что при удачном подборе детергентов и условий реакции полное дегликозилирование многих гликопротеинов можно провести достаточно быстро – за 4 ч.

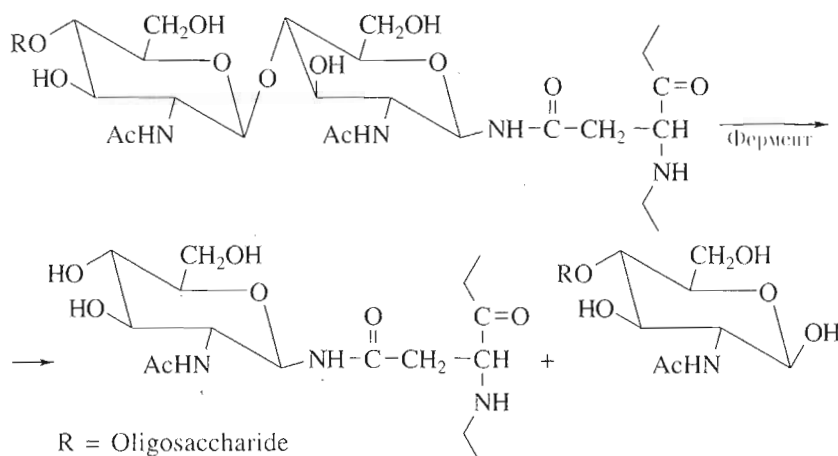
Благодаря способности воздействовать на интактные гликопротеины, которой среди ферментов данной группы в наибольшей степени обладает ПНГаза F, а также достаточно высокой устойчивости и относительной коммерческой доступности именно она является наиболее применимым на практике ферментом для дегликозилирования *N*-гликанов. Специальные “киты” для дегликозилирования ПНГазой F производятся фирмой Oxford Glycosciences Ltd. (<http://www.ogs.com>). При дегликозилировании с целью изучения полипептидной цепи следует помнить о возможно неполном прохождении реакции, это общая проблема для всех ферментативных методов.

Эндо- и экзогликозидазы гидролизуют *O*-гликозидную связь между моносахаридными остатками олигосахаридов. В то время как экзогликозидазы отщепляют единственный моносахарид с невозстанавливающего конца, эндогликозидазы обладают специфичностью в отношении внутренних групп гликановой цепи. Остановимся сначала на рассмотрении эндогликозидаз, которые в свою очередь делятся на эндо-β-*N*-ацетилглюкозамини-

дазы (КФ 3.2.1.96), эндо- α -*N*-ацетилгалактозаминидазы (КФ 3.2.1.97) и эндо- β -галактозидазы.

Источниками эндогликозидаз служат различные растения и бактерии. Причем зачастую один и тот же источник содержит и эндогликозидазы, и рассмотренные ранее ПНГазы, а иногда и экзогликозидазы. К таким источникам относятся сладкий миндаль (*sweet almond*), черные бобы (*jack bean*), *F. meningosepticum* и др.

Эндо- β -*N*-ацетилглюкозаминидаза (Эндо Н) из *Streptomyces plicatus* расщепляет внутримолекулярную связь $-\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}-$ у *N*-связанных олигосахаридов, высвобождая остаток олигосахарида с *N*-ацетилглюкозамином вместо *N,N'*-диацетилхитобиозы на восстанавливающем конце и пептидную часть с прикрепленным к ней *N*-ацетилглюкозамином (см. схему).



Интересно, что из этого же источника была выделена и другая эндо- β -*N*-ацетилглюкозаминидаза, отличающаяся своей специфичностью к низкомолекулярным олигосахаридам. На основании этого различия ферменты были названы соответственно Эндо Н (high molecular weight) и Эндо L (low molecular weight) [33, 34]. Ферменты имеют разную гликоновую специфичность. Эндо L способна воздействовать только на $\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ [33]. Эндо Н для проявления активности требуется минимальный фрагмент $\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\alpha 1-6)\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$, где концевая манноза ($\alpha 1-6$), должна быть замещена, а концевая манноза ($\alpha 1-3$) может быть незамещенной [35]. Таким образом, фермент расщепляет олигосахариды маннозобогатого и гибридного типов. Ферменты с Эндо-Н-подобной активностью встречаются и у многих других микроорганизмов.

Эндо Н – весьма удобный фермент с практической точки зрения. Во-первых, подобно ПНГазе F, вследствие своего небольшого размера (*M* 29 кДа) Эндо Н эффективно расщепляет олигосахариды не только в гликопептидах, но и в некоторых гликопротеинах, причем их предварительная денатурация часто не требуется [34]. Во-вторых, Эндо Н не теряет активность в присутствии протеиназ (проназы, химотрипсина или трипсина); детергентов, таких, как Triton, zwittergent и др.; частично сохраняет активность после кипячения. Хаотроп-

ный агент, 0.5 М NaSCN, а также 0.02% SDS повышают активность фермента в отношении гликопротеинов, содержащих Эндо-Н-устойчивые олигосахариды [27].

Эндо D из *Diplococcus pneumoniae* [36] и Эндо C₁ из *Clostridium perfringens* [37] способны расщеплять β -гликозильную связь в *N,N'*-диацетилхитобиозе как в фукозилированных, так и в нефукозилированных олигосахаридных цепях. Но в то же время эти ферменты проявляют активность, только если манноза, присоединенная связью $\alpha 1-3$, не имеет заместителей. Эндо C_{II} подобна по специфичности Эндо Н, но с тем отличием, что способна воздействовать только на цепи маннозобогатого типа [37]. Использование нескольких ферментов, обладающих узкой специфичностью, позволяет идентифицировать олигосахариды различных типов [38].

Эндо F из *F. meningosepticum* до недавнего времени считалась уникальной среди эндогликозидаз из-за своей способности расщеплять гликаны не только маннозобогатого и гибридного типа, но и комплексные [39]. Вместе с тем большинство маннозобогатых цепей в присутствии этого фермента отщепляется крайне медленно. Отмечается, что Эндо F в меньшей степени по сравнению с Эндо Н эффективна при дегликозилировании интактных гликопротеинов. Авторы работы [40] отмечают трансгликозилирующую способность Эндо F. Относительно недавние исследования по-

казали, что *F. meningosepticum* на самом деле содержит три различные эндогликозидазы, отличающиеся субстратной специфичностью и названные соответственно Эндо F₁, Эндо F₂ и Эндо F₃ [41–43]. Оказалось, что способностью воздействовать на гликаны комплексного типа обладает только минорный компонент смеси, именованный ранее Эндо F, а именно Эндо F₂. Главный компонент (Эндо F₁) по своему действию сходен с Эндо H.

Есть сообщения о выделении эндо-β-N-ацетилглюкозаминидазы из *Mucor hiemalis* (Эндо M), сходной с Эндо F по субстратной специфичности и вдобавок более быстро и полно удаляющей углеводные цепи с интактных гликопротеинов [44, 45]. Однако этот фермент в настоящее время не доступен коммерчески.

С точки зрения агликоновой специфичности оптимальным субстратом для большинства эндо-β-N-ацетилглюкозаминидаз являются гликопептиды с пятью–шестью аминокислотными остатками, где олигосахарид присоединен к одному из центральных остатков.

Из эндо-β-N-ацетилглюкозаминидаз наиболее доступной и удобной для дегликозилирования следует считать Эндо H. Она подходит для отщепления олигосахаридных цепей маннозобогащенного и гибридного типов. Необходимо иметь в виду общую для всех ферментативных методов проблему, а именно вероятность неполного отщепления гликанов.

Под действием эндогликозидаз происходит разрыв внутрикоровой связи между двумя остатками GlcNAc, что, строго говоря, дегликозилированием не является. В то же время метка на полипептиде в виде GlcNAc дает возможность локализовать сайт его гликозилирования.

Эндогликозидазы, в особенности рассматриваемые далее, находят применение в основном как инструменты исследования олигосахаридных структур, а не как инструменты дегликозилирования. Причем весьма вероятно, что в будущем доминирующую роль в исследованиях олигосахаридных структур будут играть такие методы, как ЯМР и масс-спектрометрия, а роль ферментов будет постепенно снижаться [46]. Это, впрочем, не касается ферментативных и химических методов, подразумевающих выделение олигосахаридов в интактном виде.

Эндо-α-N-ацетилгалактозаминидаза (КФ 3.2.1.97), гидролизующая O-гликозидную связь между остатками N-ацетил-α-D-галактозамина и серина (треонина) в муциноподобных гликопротеинах, была выделена из *D. pneumoniae* [47]. Этот фермент до недавнего времени был единственной известной эндогликозидазой, способной расщеплять связь между углеводной частью и серином (треонином) пептидной части. Специфич-

ность этого фермента по структуре гликана ограничивается дисахаридом Gal(β1-3)GalNAcα. Причем галактоза с невозстанавливающего конца должна быть незамещенной. Похожий фермент выделяют из *Alcaligenes* [48].

В более поздней работе сообщается о выделении фермента, аналогичным образом действующего на связь N-ацетилгалактозамин–серин (треонин) в муциноподобных гликопротеинах, из другого источника: *Streptomyces* sp. [49]. Было обнаружено, что его субстратная специфичность не ограничивается дисахаридом. Ферментативному расщеплению оказались подвержены и более крупные олигосахариды, содержащие до 12–13 мономерных звеньев. Если требуется полностью удалить углеводы с муциноподобных гликопротеинов, следует предпочесть химические методы, так как описанные выше ферменты способны лишь частично дегликозилировать белки.

Лишь некоторые из многочисленных эндо-β-галактозидаз используются для частичного дегликозилирования. Они расщепляют O-гликозидную связь, выделяя олигосахаридные фрагменты с галактозой на восстанавливающем конце. Из ферментов данного класса наиболее часто при дегликозилировании применяют эндогалактозидазу из *Escherichia freundii* [50]. Действию этого фермента подвержены цепи, состоящие из повторяющихся структур GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4), в том числе разветвленные и содержащие кератин. Такие цепи содержатся в гликолипидах и лактозаминогликанах. Эндогалактозидаза из *E. freundii* отщепляет в основном большие фрагменты олигосахаридов, расщепляя цепь ближе к восстанавливающему концу. Ферменты аналогичного действия были выделены и из других источников: *F. keratolyticus* [51] и *Bacterioides fragilis* [52].

D. pneumoniae содержит две разные эндогалактозидазы, названные D_I (КФ 3.2.1.102) и D_{II} (КФ 3.2.1.103) [53]. Было показано, что эти ферменты гидролизуют олигосахариды, являющиеся группоспецифическими детерминантами соответственно A- и B-групп крови [54].

Существуют эндогликозидазы, узнающие расщепляемую связь не только по ее первичной структуре, но и по расположению в олигосахаридной цепи. Например, эндогликозидаза из *S. perfringens* [55] или упомянутая ранее D_{II} в отличие от эндогликозидазы из *E. freundii* отщепляет повторяющиеся ди- или трисахаридные фрагменты, начиная с невозстанавливающего конца [55].

Экзогликозидазы отщепляют единственный моносакхаридный остаток с невозстанавливающего конца олигосахаридов, гликопротеинов и гликолипидов. Таким образом, эта группа ферментов имеет весьма косвенное отношение к теме настоящего обзора и рассматривается лишь вкратце.

Благодаря тому, что, за некоторым исключением, такие ферменты обладают абсолютной гликоновой и узкой агликоновой специфичностью, последовательная обработка различными экзогликозидазами может дать информацию не только о моносахаридной последовательности, но и о аномерной конфигурации каждой гликозильной связи [56]. Метод, основанный на этом свойстве экзогликозидаз, широко используется при структурных исследованиях олигосахаридов и является альтернативой физическим методам. Однако следует иметь в виду, что при использовании экзогликозидаз в структурных исследованиях возникает ряд тонкостей, которые необходимо учитывать.

Например, α -маннозидаза (КФ 3.2.1.24) из канавалии и α -фукозидаза (КФ 3.2.1.51) из эмульсина миндаля обладают абсолютной гликоновой специфичностью (т.е. способны отщеплять только α -маннозу и α -фукозу соответственно) и несколько более сложной агликоновой специфичностью. α -Маннозидаза из канавалии высвобождает маннозу из олигосахаридов, имеющих на невосстанавливаемом конце $\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}$, в 15 раз медленнее по сравнению с $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}$ и $\text{Man}(\alpha 1-6)\text{Man}$ [57]. Упомянутая α -фукозидаза расщепляет связи $\text{Fuc}(\alpha 1-3)\text{GlcNAc}$ и $\text{Fuc}(\alpha 1-4)\text{GlcNAc}$, но не $\text{Fuc}(\alpha 1-2)\text{Gal}$ или $\text{Fuc}(\alpha 1-6)\text{GlcNAc}$ [58]. В то же время аналогичный фермент из *Bacillus fulminans* и из *S. perfringens* воздействует исключительно на связь $\text{Fuc}(\alpha 1-2)\text{Gal}$ [59, 60], и, напротив, α -фукозидаза из *Turbo cornutus* и *Charonia lampas* гидролизует все известные фукозильные связи [61].

Отмечены и другие интересные особенности экзогликозидаз. Оказывается, что если фукозильрованный моносахарид находится через два или более остатков от невосстанавливающего конца олигосахаридов, ферментативная активность α -фукозидазы из эмульсина миндаля не проявляется [62]. А α -маннозидаза из канавалии не отщепляет остаток маннозы, если перед этим с помощью β -*N*-ацетилгексозаминидазы (КФ 3.2.1.52) не удалить концевой остаток β -*N*-ацетилглюкозамина с соседней ветви олигосахаридной цепи [63].

К числу исключений из правил относят ферменты, называемые β -*N*-ацетилгексозаминидазами. Они представляют собой экзогликозидазы, обладающие неабсолютной гликоновой специфичностью: расщепляют два типа связей: β -*N*-ацетилглюкозаминильные и β -*N*-ацетилгалактозаминильные [64]. Такой же неабсолютной специфичностью характеризуется β -галактозидаза из эмульсина миндаля [65]. Это свойство необычно для подавляющего большинства экзогликозидаз, имеющих, как правило, абсолютную гликоновую специфичность.

Сложное поведение демонстрирует β -галактозидаза (КФ 3.2.1.23) из канавалии в зависимости от условий проведения ферментолиза. При низкой концентрации этого фермента наблюдается быстрое расщепление связи $\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ и значительно более медленное (~в 50 раз) расщепление связи $\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}$. В то же время при высокой концентрации фермента расщепление обеих связей происходит примерно с одинаковой скоростью [66].

Исходя из того, что экзогликозидазы действуют на гликозильную связь невосстанавливающего остатка олигосахаридной цепи, можно было предполагать, что ферментативные активности по отношению к гликопротеиновым и гликопептидным субстратам не будут сильно различаться. Однако имеющиеся сведения этого предположения не подтверждают [67]. Поэтому в структурных исследованиях с использованием экзогликозидаз предпочтительнее иметь дело с гомогенными образцами олигосахаридов.

Для таких исследований разработан высокочувствительный метод с использованием радиоактивной метки. Олигосахариды восстанавливают до соответствующего альдита с помощью $\text{NaB}[\text{H}_4]$, при этом вводя ^3H в модифицированный моносахаридный остаток с восстанавливаемого конца. Далее олигосахарид подвергают действию специфической экзогликозидазы, анализируя продукты электрофоретическими или хроматографическими методами. После этого олигосахарид, содержащий радиоактивную метку, можно выделить и вновь провести цикл ферментативной обработки и анализа продуктов реакции [68, 69].

Может сложиться впечатление, что для ферментативного секвенирования олигосахаридов неизвестной структуры необходимо использовать невероятно большое количество различных экзогликозидаз. Однако это не так: любой анализ можно провести, имея 12 коммерчески доступных ферментов (Sigma, Boehringer Mannheim, Calbiochem, Genzyme, Oxford Glycosciences). Исчерпывающую информацию относительно секвенирования олигосахаридов с помощью экзогликозидаз можно прочитать в обзоре [46].

ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

С помощью химических методов расщепления гликозильной связи можно выделить в интактном виде либо олигосахаридную, либо пептидную часть конъюгата. На настоящий момент неизвестны химические методы дегликозилирования, позволяющие сохранить оба компонента. Более того, с химической точки зрения, подобрать такие условия, при которых связь гликозил-аминокислота одновременно менее устойчива, чем пеп-

тидные и гликозильные связи, пока не представляется возможным.

Для химического дегликозилирования гликопротеинов наиболее широко распространены методы с использованием безводного гидразина, боргидридов натрия или лития в щелочной среде, безводной трифторметансульфокислоты. Останемся на этих методах более подробно.

Использование безводной трифторметансульфокислоты (TFMS) в смеси с анизолом позволяет неспецифически разрушать *N*- и *O*-связанные олигосахариды до моносахаридов без заметной деградации белковой части, более устойчивой к кислотному гидролизу [70]. Отсутствие заметного нарушения первичной структуры пептида в ходе реакции было продемонстрировано убедительно, но единого мнения относительно сохранения третичной структуры до сих пор нет [71, 72]. Тем не менее метод представляется ценным в тех случаях, когда из гликопротеина необходимо выделить дегликозилированный полипептид в интактном виде. Эта проблема особенно актуальна при изучении муциноподобных гликопротеинов, так как использование TFMS – единственный метод, позволяющий полностью дегликозировать такие вещества.

Применение TFMS оказалось неэффективным для дегликозилирования сиалогликопротеинов [73], поэтому для таких объектов было предложено предварительно удалять сиаловые кислоты [74]. Далее десилированный гликопротеин может быть полностью дегликозилирован по стандартной методике [70].

Другая проблема данного метода дегликозилирования состоит в том, что *N*- и *O*-связанные *N*-ацетилгексозамины под воздействием TFMS не отщепляются, хотя все периферийные моносахариды удаляются. В этом случае на второй стадии оставшиеся сахара окисляют в присутствии перйодата натрия с раскрытием пиранозного кольца и образованием C3,C4-диальдегида [74, 75]. Затем повторное проведение реакции с TFMS в случае *N*-, либо β -элиминирования в мягких щелочных условиях – в случае *O*-связанных сахаридов приводит к получению полностью дегликозилированного полипептида.

Метод считается наиболее доступным и подходящим для неселективного отщепления *N*- и *O*-связанных олигосахаридов при минимальной деградации полипептидной цепи с целью дальнейшего изучения, в частности секвенирования последней. Специальные “киты” производятся фирмой Oxford Glycosciences, Ltd.

К следующей группе методов следует отнести химическое дегликозилирование по механизму β -элиминирования путем обработки в мягких щелочных условиях. Во избежание деградации щелочлабильных связей реакцию проводят в при-

сутствии восстанавливающего реагента, обычно NaBH_4 или LiBH_4 [76].

Такой подход позволяет отщеплять преимущественно *O*-гликаны в виде олигозилальдитолов, однако полностью избежать отщепления *N*-гликанов при этом не удается. Показано, что связь между остатками аспарагина и *N*-ацетилглюкозамина расщепляется с выделением олигозилальдитолов на 5–10%, а основная масса *N*-олигозиллов (75–80%) ввиду практически полной деградации пептидной цепи в результате реакции превращается в олигозиласпарагины [77]. Оптимальными, с точки зрения селективности и полноты отщепления *O*-гликанов, можно считать следующие условия реакции: 0.05 М NaOH, 1 М NaBH_4 , 45°C, 16 ч [78]. Применение более жестких условий (0.2–1 М NaOH, 1 М NaBH_4 , 100°C) приводит к полному расщеплению олигозиласпарагинов [79, 80]. Однако в таком исполнении метод применяется редко из-за значительной деградации структуры всех олигосахаридных цепей. По этой же причине очень ограниченно используется метод трифторацетолита [81].

Метод мягкой щелочной обработки в присутствии NaBH_4 используется при дегликозилировании гликопротеинов, содержащих *O*-связанные олигосахариды, с целью наработки последних. При наличии также *N*-связанных олигосахаридов надо иметь в виду, что в реакционной смеси будет присутствовать примесь олигозиласпарагинов и олигозилальдитолов, полученных из *N*-связанных олигосахаридов.

Заслуживает внимания оптимизированный метод восстановительного расщепления, включающий в себя обработку раствором, содержащим 2 М LiBH_4 , 25 мМ LiOH, 50 мМ цитрата Li в 70% водном *трет*-бутаноле с последующим гидролизом полученного гликозиламина водным раствором уксусной кислоты [82]. В ходе реакции пептидные связи белка интенсивно разрушаются с образованием аминокспиртов, но *N*-деацетилирование гексозаминов при этом не происходит. После обработки овомукоида, флавопротеина, рибонуклеазы В, гемагглютинина и трансферрина по данной методике обнаружено расщепление до 80% *N*-гликозильных связей. В более поздней работе этой же группой исследователей установлено, что присутствие Cd^{2+} и $\text{Na}_4\text{-EDTA}$ ингибирует расщепление пептидных и *N*-гликозиламидных связей [83]. Таким образом, эта оптимизированная методика позволяет селективно отщепить интактные *O*-гликаны при минимальном (3–5%) количестве побочных продуктов. Далее для выделения *N*-гликанов можно использовать методику [82].

Действие безводного гидразина в настоящее время широко применяется для отщепления, выделения и анализа интактных *N*- и *O*-связанных олигосахаридов. Важное преимущество этого ме-

тогда в сравнении с использованием боргидрида натрия или лития – это возможность выделить олигосахариды в невозстановленном виде. Причем, варьируя условия проведения реакции, можно добиться либо селективного отщепления *O*-связанных олигосахаридов (60°C, 5 ч), либо отщепления всех (*N*- и *O*-связанных) олигосахаридов (95°C, 4 ч), либо последовательного отщепления сначала *O*-, а потом *N*-связанных олигосахаридов с высоким (>85%) выходом [77].

В ходе реакции олигосахарид может подвергнуться *N*-деацетилированию и превращению в гидразидные производные. Для исключения побочных реакций с участием последних после удаления гидразина под вакуумом проводят ре-*N*-ацетилирование смеси уксусным ангидридом в разбавленном растворе бикарбоната натрия [84].

После реацетилирования и очистки от пептидной фракции олигосахаридный пул, состоящий в основном из невозстановленных олигосахаридов, содержит небольшое количество олигосахаридов в виде ацетогидразидного производного. Эти производные можно количественно регенерировать в олигосахарид действием 1 мМ раствора ацетата меди (II) в 1 мМ уксусной кислоте [84].

Поскольку гидразин атакует амидные связи неселективно, пептидная цепь полностью деградирует, превращаясь в гидразиды соответствующих аминокислот.

Оптимизированный гидразинолиз [77, 84] широко применяется для селективного отщепления *O*- и затем *N*-связанных олигосахаридов. Коммерчески доступны специальные “киты” (Oxford Glycosciences, Ltd., <http://www.ogs.com>), а также установка, автоматизирующая данную процедуру [85].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выбор оптимального подхода к дегликозилированию зависит от цели исследования. Рассмотрим это на примере некоторых распространенных случаев, возникающих в исследовательской практике.

Если планируется изучать, например секвенировать, полипептидную цепь гликопротеина, для неселективного удаления гликанов следует предпочесть химический метод с использованием TFMS. При этом нет необходимости заранее знать углеводный состав, так как в этих условиях разрушаются олигосахариды обоих типов.

Предварительная информация об углеводном составе гликоконъюгата обычно позволяет судить о типе олигосахаридов, присутствующих в молекуле. Наличие такой информации иногда делает целесообразным применение дегликозилирующих ферментов, в первую очередь ПНГазы F, способной количественно отщеплять *N*-связанные гликаны маннозобогатого и гибридного

типов после предварительной денатурации интактного белка. В этом случае отщепленные олигосахариды можно будет выделить и проанализировать. Однако, если можно предположить наличие также *O*-связанных или *N*-связанных олигосахаридов комплексного типа, использование TFMS выглядит предпочтительней.

Если стоит обратная задача, т.е. изучение заранее неизвестных олигосахаридов из гликоконъюгата, можно применять гидразинолиз (для селективного или неселективного отщепления *N*- и *O*-гликанов); отщепление боргидридом лития или натрия в щелочной среде (для селективного или неселективного отщепления *N*- и *O*-гликанов). Применение этих методов, вообще говоря, было бы логичнее назвать депротеинированием.

Применение эндо- и экзогликозидаз для изучения структуры олигосахаридов *en bloc* при наличии информации по углеводному составу гликопротеина в ряде случаев оказывается успешным. Но в общем случае для получения более надежных результатов целесообразнее сначала отделить олигосахаридные цепи от пептидного материала. Методы изучения структуры олигосахаридов систематически рассмотрены другими авторами [46, 86] и поэтому в данном обзоре подробно не обсуждались.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Glycoproteins. The New Comprehensive Biochemistry. V. 29B / Eds J. Montreuil, H. Schachter, J.F.G. Vliegthart. Amsterdam: Elsevier Science B. V. 1995.
2. Carlsson S.L.R. // Glycobiology: A Practical Approach / Eds M. Fukuda, A. Kobata. Oxford: Oxford University Press, 1993. P. 1–26.
3. Montreuil J. // Adv. Carb. Biochem. 1979. V. 37. P. 157–223.
4. Хьюз Р. Гликопротеины: Пер. с англ. М.: Мир, 1985.
5. Kisailus E.C., Allen H.J. // Glycoconjugates: Composition, Structure and Functions / Eds E.C. Kisailus, H.J. Allen. N.Y.: Marcel Dekker Inc. 1992. P. 13–32.
6. NC IUPAC–IUB // Eur. J. Biochem. 1986. V. 159. P. 1–6.
7. Rudd P.M., Scragg I.G., Coghill E.C. // Glycoconj. J. 1992. V. 9. P. 86–91.
8. Lis H., Sharon N. // Eur. J. Biochem. 1993. V. 218. P. 1–27.
9. Hart G.W., Haltiwanger R.S., Holt G.D., Kelly W.G. // Annu. Rev. Biochem. 1989. V. 58. P. 841–874.
10. Montreuil J. // Pure Appl. Chem. 1975. V. 42. P. 431–477.
11. Деревицкая В.А. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. С. 1605–1625.
12. Hofsteenge J., Muller D.R., De Beer T., Loffler A., Richter W.J., Vliegthart J.F.G. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 13524–13530.

13. *Montreuil J.* // *Comprehensive Biochemistry*. V. 19B. Part II / Ed. A. Neuberger, Amsterdam: Elsevier, 1982. P. 1–190.
14. *Ogata S.I., Lloyd K.O.* // *Anal. Biochem.* 1982. V. 119. P. 351–359.
15. *Калиберда Е.Н.* // *Биоорганическая химия*. 1991. Т. 17. С. 581–595.
16. *Risley J.M., Van Etten R.L.* // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. P. 15488–15494.
17. *Siguyama K., Ishihara H., Tejima S., Takahashi N.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983. V. 112. P. 155–160.
18. *Калиберда Е.Н., Шемякин В.В., Антонов В.К.* // *Биоорганическая химия*. 1990. Т. 16. С. 751–757.
19. *Taga E., Waheed A., Van Etten R.* // *Biochemistry*. 1984. V. 23. P. 815–822.
20. *Suzuki T., Seko A., Kitajima K., Inoue Y., Inoue S.* // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 17611–17618.
21. *Suzuki T., Seko A., Kitajima K., Inoue Y., Inoue S.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. V. 194. P. 1124–1130.
22. *Plummer T.H.Jr., Phelan A.W., Tarentino A.L.* // *Eur. J. Biochem.* 1987. V. 163. P. 167–173.
23. *McGovern M.M., Aula P., Desnick R.J.* // *J. Biol. Chem.* 1983. V. 258. P. 10743–10747.
24. *Tarentino A.L., Plummer T.H., Jr.* // *Fed. Proc.* 1984. V. 43. P. 1552.
25. *Tarentino A.L., Plummer T.H., Jr.* // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. P. 10776–10780.
26. *Plummer T.H., Jr., Tarentino A.L.* // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. P. 10243–10246.
27. *Maley F., Trimble R.B., Tarentino A.L.* // *Anal. Biochem.* 1989. V. 180. P. 195–204.
28. *Tretter V., Altmann F., Marz L.* // *Eur. J. Biochem.* 1991. V. 199. P. 647–652.
29. *Plummer T.H., Jr., Elder J.H., Alexander S., Phelan A.W., Tarentino A.L.* // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. P. 10700–10704.
30. *Chu F.K.* // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. P. 172–177.
31. *Tarentino A.L., Gomez C.M., Plummer T.H., Jr.* // *Biochemistry*. 1985. V. 24. P. 4665–4671.
32. *Nuck R., Zimmermann M., Sauvageot D., Josic D., Reutter W.* // *Glycoconj. J.* 1990. V. 7. P. 279–286.
33. *Tarentino A.L., Maley F.* // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. P. 811–817.
34. *Tarentino A.L., Plummer T.H., Jr., Maley F.* // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. P. 818–824.
35. *Tarentino A.L., Plummer T.H.* // *Methods in Enzymology*. 1994. V. 230. P. 44–57.
36. *Tai T., Yamashita K., Ogata-Arakawa M., Koide N., Muramatsu T., Iwashita S., Inoue Y., Kobata A.* // *J. Biol. Chem.* 1975. V. 250. P. 8569–8575.
37. *Ito S., Muramatsu T., Kobata A.* // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1975. V. 171. P. 78–82.
38. *Kobata A.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977. V. 78. P. 434–437.
39. *Elder J., Alexander S.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1982. V. 79. P. 4540–4545.
40. *Trimble R., Atkison P., Plummer T.H.* // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 261. P. 12000–12007.
41. *Trimble R.B., Tarentino A.L.* // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 1646–1651.
42. *Tarentino A.L., Quinones G., Schrader W.P., Changchien L.-M., Plummer T.H., Jr.* // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 3868–3872.
43. *Tarentino A.L., Quinones G., Changchien L.-M., Plummer T.H., Jr.* // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 9702–9708.
44. *Kadowaki S., Yamamoto K., Fujisaki M., Kumagai H., Tochikura T.* // *Agric. Biol. Chem.* 1988. V. 52. P. 2387–2389.
45. *Kadowaki S., Yamamoto K., Fujisaki M., Izumi K., Tochikura T., Yokoyama T.* // *Agric. Biol. Chem.* 1990. V. 54. P. 97–106.
46. *Jacob G.S., Scudder P.* // *Methods in Enzymology*. 1994. V. 230. P. 280–299.
47. *Unemoto J., Bhavanandan V.P., Davidson E.A.* // *J. Biol. Chem.* 1977. V. 252. P. 8609–8614.
48. *O'Neill R.A.* // *J. of Chromatography A*. 1996. V. 720. P. 201–215.
49. *Iwase H., Ishii I., Ishihara K., Tanaka Y., Omura S., Hotta K.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988. V. 151. P. 422–428.
50. *Fukuda M.N., Matsumura G.* // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. P. 6218–6225.
51. *Ketamikado M., Ito M., Li Y.-T.* // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. P. 3906–3909.
52. *Scudder P., Uemura K., Dolby J., Fukuda M.N.* // *Biochem. J.* 1983. V. 213. P. 485–494.
53. *Fukuda M.N., Hakomori S.* // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. P. 446–455.
54. *Takasaki S., Kobata A.* // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. P. 3606–3609.
55. *Fukuda M.N.* // *Biochemistry*. 1985. V. 24. P. 2154–2163.
56. *Kobata A.* // *Anal. Biochem.* 1979. V. 100. P. 1–14.
57. *Tai T., Yamashita K., Ogata A.M., Koide N., Muramatsu T., Iwashita S., Inoue U., Kobata A.* // *J. Biol. Chem.* 1975. V. 250. P. 8569–8575.
58. *Ogata A.M., Muramatsu T., Kobata A.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1977. V. 181. P. 353–358.
59. *Kochibe N.* // *J. Biochem. (Tokyo)* 1973. V. 74. P. 1141–1145.
60. *Aminoff D.* // *Methods Enzymol.* 1973. V. 28. P. 763.
61. *Nishigaki M., Muramatsu T., Kobata A., Maeyama K.* // *J. Biochem. (Tokyo)* 1974. V. 75. P. 509–513.
62. *Yamashita K., Tachibana Y., Kobata A.* // *J. Biol. Chem.* 1977. V. 252. P. 5408–5411.
63. *Liang C.-J., Yamashita K., Mullenberg C.G., Shichi H., Kobata A.* // *J. Biol. Chem.* 1979. V. 254. P. 6414–6418.
64. *Li Y.-T., Li S.-C.* // *Methods Enzymology*. 1973. V. 28. P. 699.
65. *Helferich B., Kleinschmidt T.* // *Z. Physiol. Chem.* 1967. V. 348. P. 753–757.
66. *Arakawa M., Ogata S., Muramatsu T., Kobata A.* // *J. Biochem. (Tokyo)* 1974. V. 75. P. 707–711.
67. *Brady R.O., Gal A.E., Kanfer J.N., Bradley R.M.* // *J. Biol. Chem.* 1965. V. 240. P. 3766–3770.
68. *Kobata A., Ginsburg V.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1972. V. 150. P. 273–281.

69. Nishigaki M., Yamashita K., Matsuda I., Arachima S., Kobata A. // *J. Biochem. (Tokyo)* 1978. V. 84. P. 823–834.
70. Edge A.S.B., Faltynek C.R., Hof L., Reichert L.E., Weber Jr. // *Anal. Biochem.* 1981. V. 118. P. 131–137.
71. N. Rao Thotakura, LiCalzi L., Weintraub B.D. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 11527–11534.
72. Rusiniak M.E., Bedi G.S., Back N. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1991. V. 179. P. 927–932.
73. Woodward H.D., Ringler N.J., Selvakumar R., Siment I.M., Bhavanandan V.P., Davidson E.A. // *Biochem.* 1987. V. 31. P. 639–648.
74. Shantha Raju T., Davidson E.A. // *Biochem. and Mol. Biol. Int.* 1994. V. 34. P. 943–954.
75. Gerken T.A., Rekha Gupta, Jentoft N. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. P. 639–648.
76. Ogata S., Lloyd K.O. // *Anal. Biochem.* 1982. V. 119. P. 351–359.
77. Pater T., Bruce J., Merry A., Bigge C., Wormald M., Jagues A., Parekh R. // *Biochemistry.* 1993. V. 32. P. 679–693.
78. Iyer R.N., Carlson D.M. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1971. V. 142. P. 101–105.
79. Argade S.P., Daves G.D., Van Halbeek H., Al-hadeef J.A. // *Glycoconj. J.* 1989. V. 6. P. 45–56.
80. Lee Y.C., Scocca J.R. // *J. Biol. Chem.* 1972. V. 247. P. 5753–5758.
81. Nilsson B., Svensson S. // *Carbohydr. Res.* 1979. V. 72. P. 183–190.
82. Likhoshesterov L.M., Novikova O.E., Piskarev V.E., Trusikhina E.E., Derevitskaya V.A., Kochetkov N.K. // *Carbohydr. Res.* 1988. V. 178. P. 155–163.
83. Likhoshesterov L.M., Novikova O.S., Derevitskaya V.A., Kochetkov N.K. // *Carbohydr. Res.* 1990. V. 199. P. 67–76.
84. Patel T.P., Parekh R.B. // *Meth. Enzymol.* 1994. V. 230. P. 57–66.
85. Allan E.-L., Merry T. // *Glycobiology.* 1992. V. 2. P. 267.
86. Dwek R.A., Edge C.J., Harvey D.J., Wormald M.R. // *Annu. Rev. Biochem.* 1993. V. 62. P. 65–100.

Deglycosylation of Glycoproteins

A. A. Vinogradov[#] and I. A. Yamskov

*Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 28, GSP-1, Moscow, 117813 Russia*

Glycosylation procedures and their application for the elucidation of glycoprotein structure and structure–function relations, as well as for the development of analytical systems for clinical practice are reviewed. For some common cases found in research practice, the choice of optimal deglycosylation methods is discussed. Current views on the primary structure of glycoproteins are described briefly.

Key words: glycoproteins, deglycosylation, oligosaccharides, polypeptides

[#] To whom correspondence should be addressed; phonelfax: +7 (095) 135-5037; e-mail: alvin@ineos.ac.ru.