



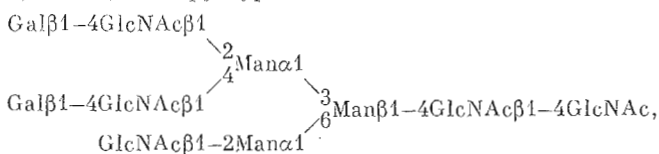
УДК 578.114.5 : 578.832.1А.088.5

СТРОЕНИЕ ГЛАВНЫХ УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ КОМПЛЕКСНОГО ТИПА ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА А/ЛЕНИНГРАД/385/80 (H3N2)

*Арбатский Н. П., Желтова А. О., Юртов Д. В.,
Деревницкая В. А., Кочетков Н. К.*

*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

Методами периодатного окисления, ферментативного и частичного кислотного гидролиза и ацетоллиза установлены основные особенности строения четырех главных углеводных цепей комплексного типа в гемагглютинине вируса гриппа А/Ленинград/385/80 (H3N2). Общим структурным элементом их является олигосахарид



содержащий различное число остатков фукозы.

Как было установлено рядом авторов [1—6], главный поверхностный антиген вируса гриппа — гемагглютинин (HA) содержит большое число углеводных цепей различного типа. Роль этих цепей пока не ясна, однако можно предполагать, что, являясь составной частью гемагглютинина, они участвуют в формировании его пространственной структуры и, следовательно, соответствующей антигенной активности. С другой стороны, структура углеводных цепей должна отражать состояние гликозилирующего аппарата клетки-хозяина. Поэтому выяснение особенностей гликозирования HA может оказать помощь в понимании характера взаимоотношений вирус — клетка.

Ранее с помощью нового метода отщепления N-связанных углеводных цепей гликопротеинов под действием LiBH_4 нами было выделено большое число восстановленных олигосахаридов [6], являющихся углеводными фрагментами HA вируса гриппа А/Ленинград/385/80 (H3N2). Причем оказалось, что общее число этих олигосахаридов и их соотношение (в том числе соотношение олигоманнозидных и комплексных цепей) примерно одинаково в тяжелой (HA1) и легкой (HA2) цепях HA, несмотря на то что HA2 имеет лишь одну потенциальную точку гликозилирования (сайт), а HA1 — шесть сайтов [4]. Строение главных олигоманнозидных цепей гемагглютинина было установлено ранее [7]. Настоящая работа посвящена изучению строения главных олигосахаридов комплексного типа.

Среди выделенных с помощью хроматографии на биогеле Р-6 и ВЭЖХ на колонках с обращенной и аминофазой олигосахаридов комплексного типа главными являются олигосахариды (ОС) 13, 14, 16 и 19 [6]. Относительное количество их примерно одинаково и в 5—10 раз больше других олигосахаридов этого типа; в сумме они составляют ~50% всех углеводов HA. Олигосахариды 13, 14, 16 и 19 содержат одинаковое число остатков N-ацетилглюкозамина, маннозы, галактозы и N-ацетилглюкозаминита (~4 : 3 : 2 : 1) и различаются лишь содержанием фукозы (0, 2, 2 и 1 остаток фукозы соответственно, таблица). Удаляя фукозу с помощью мягкого кислотного гидролиза, мы показали, что эти олигосахариды действительно составляют группу одинаковых (или очень близких) по структуре соеди-

Мольное соотношение моносахаридов в олигосахаридах и их фрагментах *

Олигосахариды и фрагменты	GlcNAc	Man	Gal	Fuc	GlcNAc-ol
ОС-13	4,0	3	2,1	Следы	0,8
ОС-13а	2,6	3	1,8	0	—
Фракция 13б	2,7	2	Следы	0	0
13в	1,2	2	0	0	—
13г	3,2	2	1,8	Следы	—
13д	2,3	1	1,6	0	—
13е	1,9	1	0,2	Следы	—
ОС-14	4,1	3	2,3	2,2	0,7
ОС-14а	2,7	3	1,9	2,0	—
ОС-16	3,7	3	2,1	1,8	0,7
ОС-16а	2,6	3	1,6	1,7	—
ОС-19	3,6	3	2,1	1,0	0,6
ОС-19а	2,4	3	1,8	0,7	—
Фракция 19б	2,8	2	0	0	0,4

* Исходные олигосахариды и фрагменты после действия β-N-ацетилглюкозаминидазы (а), деградации по Смитсу (б), двойной деградации по Смитсу (в), ацетолиза (г, д, е; см. рис. 2).

нений с микрогетерогенностью, обусловленной различным числом и положением остатков фукозы.

Как было показано нами ранее [8, 9], гидролиз олигосахаридов 0,05 н. CF_3COOH при 100°C позволяет избирательно отщеплять остатки фукозы, не затрагивая другие гликозидные связи. Таким образом, проводя гидролиз различное время и идентифицируя образующиеся соединения, можно наблюдать появление промежуточных продуктов (в случае олигосахаридов с двумя остатками фукозы), а затем конечного олигомера. В нашем случае хроматография на обращенной фазе продуктов гидролиза каждого олигосахарида давала сложную картину, которая существенно упрощалась после дополнительного N-ацетилирования (рис. 1). По-видимому, увеличение числа продуктов обусловлено частичным N-деацетилированием N-ацетилглюкозаминита, кислотная лабильность N-ацетильной группы которого отмечалась нами ранее [10].

Так, при гидролизе ОС-16 в течение 1 ч появляется олигосахарид, хроматографически идентичный ОС-19, содержащему остаток фукозы; при увеличении времени гидролиза до 4 ч этот компонент, так же как и исходный олигомер, практически полностью исчезает, а главный продукт оказывается идентичным по хроматографической подвижности ОС-13, не содержащему фукозы. Аналогичные превращения наблюдаются и при гидролизе ОС-14, также имеющего два остатка фукозы, хотя в данном случае исходный ОС-14 и не содержащий фукозы конечный продукт хроматографически не отличаются друг от друга. Тем не менее видно, что сначала уменьшается количество исходного ОС-14 и появляется промежуточный продукт, идентичный ОС-19, который затем исчезает, превращаясь в продукт, идентичный ОС-13. При гидролизе ОС-19 наблюдаются только два компонента: исходный ОС-19 и продукт, идентичный ОС-13.

На основании этих результатов можно предполагать, что все четыре олигосахариды имеют один и тот же скелет из остатков N-ацетилглюкозаминна, маннозы, галактозы и N-ацетилглюкозаминита, к которому присоединено различное число остатков фукозы. ОС-14 и ОС-16, содержащие по два остатка фукозы, различаются, очевидно, только их положением.

Поскольку при хроматографии на биогеле Р-6 олигосахариды 13, 14, 16 и 19 выходят раньше ундекасахарида $\text{Man}_9\text{GlcNAcGlcNAc-ol}$ [6] и содержат четыре остатка N-ацетилглюкозаминна, можно предполагать, что они являются триантенными. В то же время наличие двух остатков галактозы показывает, что один из остатков N-ацетилглюкозаминна не замещен. Таким образом, в качестве наиболее вероятных вариантов структуры этих олигосахаридов (без учета остатков фукозы) могут быть струк-

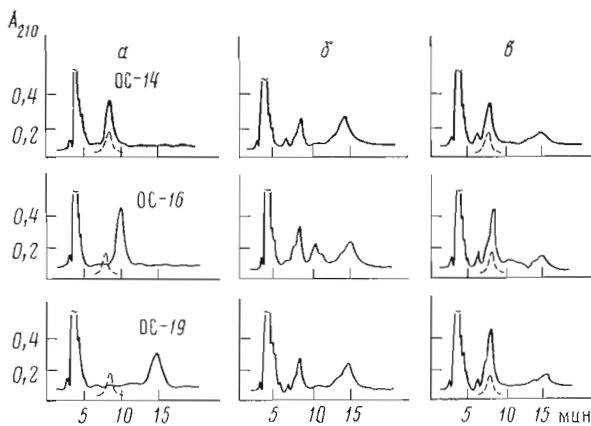


Рис. 1

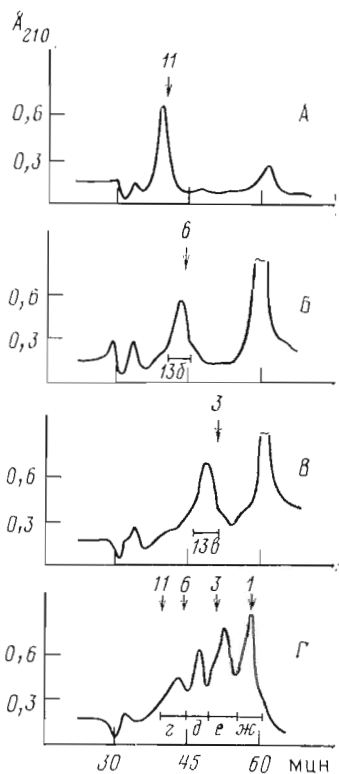
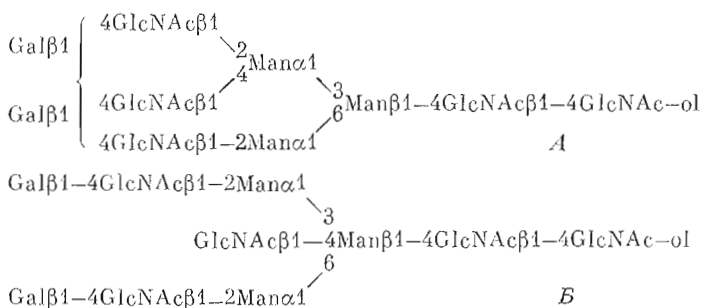


Рис. 2

Рис. 1. Хроматография на колонке (250 × 4,6 мм) с обращенной фазой Lichrosorb RP-8 олигосахаридов 14, 16 и 19 (а) и продуктов их гидролиза 0,05 М CF₃COOH (100° С) 1 ч (б) и 4 ч (в) (после N-ацелирования). Элюент — вода, 0,5 мл/мин. Пунктиром показано положение OC-13, не содержащего фукозы

Рис. 2. Гель-хроматография OC-13 (А) и его фрагментов, образующихся при деградации по Смиту (Б), повторной деградации по Смиту (В) и ацетоллизе (Г). Колонка (1500 × 1,6 мм) с TSK-40; элюент — вода, 0,05 мл/мин. Стрелками обозначены места выхода: 11 — ундекасахарида Man₅GlcNAcGlcNAc-ol [7]; 6 — гексасахарида Fucα1-2Galβ1-3(GlcNAcα1-4Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc-ol [9]; 3 — трисахарида GlcNAcα1-4Galβ1-3GalNAc-ol [10]; 1 — GlcNAc. Строчными буквами б — ж обозначены продукты деградации OC-13

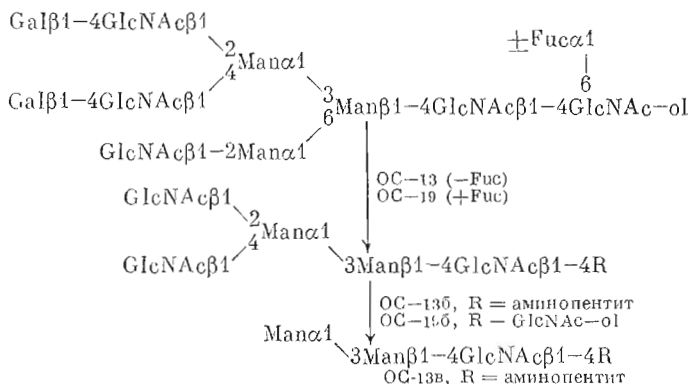
туры А и Б, обнаруженные в составе различных гликопротеинов, в том числе в гемагглютинине вируса гриппа [5].



Наличие в олигосахаридах 13, 14, 16 и 19 конечного остатка N-ацетилглюкозамина было подтверждено в результате их обработки β-N-ацетилглюкозаминидазой. Хроматографией продуктов ферментативного гидролиза на колонках Lichrosorb RP-8 и Alltech-NH₂ были выделены олигосахариды, неотличимые по хроматографической подвижности от исходных, однако с другим моносахаридным составом: в каждом случае наблюдалась потеря одного из четырех остатков N-ацетилглюкозамина

(таблица). Кроме того, после хроматографии продуктов ферментативного гидролиза ОС-16 на колонке с ТСК-40 в моносахаридной фракции (после ее гидролиза) обнаружен гликозамин ($\sim 0,5$ моль/моль ОС); другие моносахариды присутствовали в следовых количествах.

Выбор между структурами А и В был осуществлен в результате деградации олигосахаридов по Смигу. Продукты деградации олигосахаридов ОС-13 и ОС-19 были разделены на колонке с ТСК-40 (рис. 2Б) и в обоих случаях из «олигосахаридной зоны» выделены одинаковые по размеру фрагменты (13б и 19б), выходящие несколько раньше гексасахарида. При хроматографии на колонке Lichrosorb RP-8 эти фрагменты также имели одинаковое время элюции. Согласно таблице, фрагменты содержат N-ацетилгликозамин и маннозу в соотношении $\sim 3 : 2$. Кроме того, оказалось, что во фрагменте 19б остаток N-ацетилгликозаминита сохранился, а во фрагменте 13б он окислился до аминопентита, идентифицированного с помощью анализатора аминокислот сравнением с заведомым образцом. Отсюда следует, что в ОС-19 остаток N-ацетилгликозаминита замещен остатком фукозы в положение С6 и тем самым предохраняет его от окисления. В не содержащем фукозу ОС-13 остаток N-ацетилгликозаминита замещен только по С4 и поэтому окисляется с образованием аминопентита. Размер фрагментов 13б и 19б (\geq гексасахарид) и наличие в них трех остатков N-ацетилгликозамина (таблица) соответствует продуктам деградации структуры А, представленным на схеме. Следовательно, оба остатка N-ацетилгликозамина в $1 \rightarrow 3$ -ветви олигосахаридной цепи ОС-13 и ОС-19 замещены остатками галактозы.

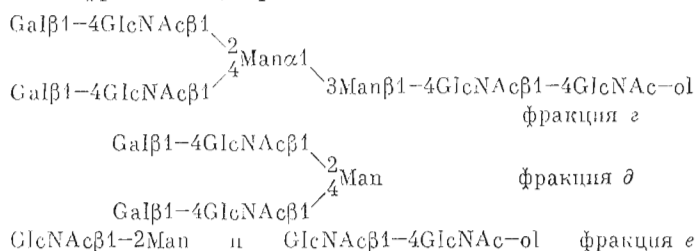


Таким образом, вариант В структуры можно отбросить, так как в этом случае при деградации по Смигу должен образовываться трисахарид $\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{R}$.

Строение фрагмента 13б подтверждено повторной деградацией его по Смигу. Выделенный при этом фрагмент (13в) размером несколько более трисахарида (рис. 2Б) содержал N-ацетилгликозамин и маннозу в соотношении $\sim 1 : 2$ (таблица), что соответствует структуре 13в (см. схему). Полученный результат подтверждает, что остаток α -маннозы в сохранившейся $1 \rightarrow 3$ -ветви фрагмента 13в замещен двумя остатками N-ацетилгликозамина, предохраняющими его от окисления (по литературным данным, он замещен, как правило, по С2 и С4 [11]).

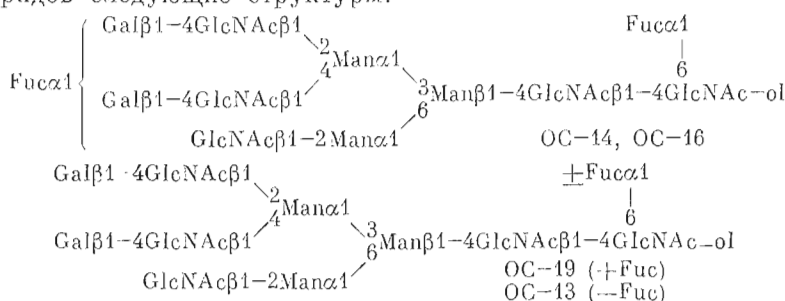
Мы попытались уточнить распределение остатков галактозы в $1 \rightarrow 3$ - и $1 \rightarrow 6$ -ветвях олигосахарида с помощью ацетоллиза, который часто применяют при изучении строения олигоманнозидных цепей, рассчитывая избирательно отщепить $1 \rightarrow 6$ -ветвь олигосахарида. Однако при ацетоллизе ОС-13 в рекомендованных условиях [12] расщепление различных маннозидных связей проходило практически равномерно. В результате ацетоллиза образовалось несколько фрагментов различного размера (рис. 2, Г). Они были выделены, и их моносахаридный состав установлен (таблица). Следует подчеркнуть, что фракция ж в зоне моносахаридов практически не содержала углеводов и, следовательно, ОС-13 распадался в основном на олигосахаридные фрагменты без дальнейшего гидролиза их до моносахаридов.

Соотнесение состава фракций ε — e с размером содержащихся в них олигосахаридов позволяет заключить, что главными продуктами ацетоллиза являются фрагменты, представленные ниже:



Наиболее важным результатом ацетоллиза является тот факт, что во фракциях ε и ϑ соотношение маннозы и галактозы равно $\sim 2 : 2$ и $\sim 1 : 2$ соответственно, а в дисахаридной фракции e обнаружено лишь очень небольшое количество галактозы. Это подтверждает сделанный после деградации по Смуту вывод о том, что в основном оба остатка галактозы находятся в 1 \rightarrow 3-ветви олигосахаридной цепи.

На основании всех приведенных выше данных мы предлагаем для олигосахаридов следующие структуры:



В результате проведенного исследования установлено, что гемагглютинин вируса гриппа А/Ленинград/385/80 (H3N2) содержит олигоманнозидные [7] и комплексные (в основном незавершенные триантенные) углеводные цепи в соотношении 1 : 2—3 [6]. Это в целом согласуется с данными Уорда и сотр. [4], показавших наличие 2—3 олигоманнозидных и 4—5 комплексных цепей в HA вируса гриппа А/Aichi/2/68 (X-31) и А/Memphis/102/72 (оба H3N2). Однако по поводу распределения углеводных цепей различного типа в HA1 и HA2 имеются значительные расхождения. По данным вышеупомянутых авторов, в HA1 находятся 2—3 олигоманнозидные и 3—4 комплексные цепи, а в HA2 — только одна цепь комплексного типа. Из наших данных следует, что, несмотря на наличие лишь одного сайта гликозирования в HA2 и шести сайтов в HA1, они не различаются как по разнообразию, так и соотношению углеводных цепей олигоманнозидного и комплексного типа.

С другой стороны, полученные нами результаты резко отличаются от данных Кубата и сотр. [5], из которых следует обратное найденному нами соотношение олигоманнозидных и комплексных цепей в HA вируса гриппа X-31.

Такие серьезные противоречия в отношении количества олигоманнозидных и комплексных цепей в HA и распределения их в HA1 и HA2 можно объяснить, лишь допуская (вопреки существующему представлению), что в каждом отдельном сайте гликозирования HA может находиться не какая-то определенная углеводная цепь, а, «в зависимости от обстоятельств», цепи различного типа, в том числе олигоманнозидная или комплексная (как это показано нами для HA2), причем их соотношение зависит как от типа клетки, так и от штамма инфицирующего ее вируса.

К такому же выводу приводит анализ результатов, полученных при изучении гликопротеинов других вирусов, выращенных в различных клетках [3, 13—17].

Можно предположить, что степень трансформации углеводной цепи в каждом отдельном сайте зависит от двух факторов: первичной (а следовательно, и пространственной) структуры пептидной цепи, которая обуславливает степень доступности углеводной цепи для ферментов, участвующих в ее процессинге, и от того, насколько строго выполняется в каждой клетке синхронность конформационных изменений пептидной цепи и определенных стадий трансформации углеводной цепи. Одновременное действие этих факторов и приводит к наблюдаемой довольно сложной зависимости структуры углеводной цепи и степени ее гетерогенности в каждом отдельном сайте от типа вируса и клетки-хозяина.

Экспериментальная часть

Моносахаридный состав олигосахаридов определяли с помощью анализатора углеводов Biotronik LC2000 (ФРГ) после гидролиза 3 М CF_3COOH (100°C , 6 ч); детекция при 570 нм после реакции с бичинхониватом [6, 18]. Глюкозамин и глюкозаминит определяли после гидролиза олигосахарида 4 н. HCl (100°C , 6 ч) на анализаторе аминокислот Biotronik LC 4020 (ФРГ). Высокоэффективную жидкостную хроматографию олигосахаридов и их фрагментов проводили на хроматографе Altex (США), модель 332, с использованием спектрофотометра Клауег (ФРГ) и колонок ($250 \times 4,6$ мм) с Lichrosorb RP-8 и Alltech NH_2 (Alltech, США). Для микрогель-хроматографии олигосахаридов использовали термостабируемую при 50°C колонку ($1500 \times 1,6$ мм) в виде тefлонового капилляра, наполненного гелем TSK-40 (Superfine, Toyo Soda, Япония); элюент — вода (0,05 мл/мин), детекция при 210 нм. В работе использовалась β -N-ацетилглюкозаминидаза из почки быка (Serva).

Мягкий кислотный гидролиз олигосахаридов. 5 нмоль олигосахарида в 20 мкл 0,05 М CF_3COOH нагревали в запаянной ампуле при 100°C (1 или 4 ч), раствор высушивали в вакууме над P_2O_5 и NaOH , остаток растворяли в 20 мкл 0,05 М Na_2CO_3 и 20 мкл метанола, приливали 7 мкл уксусного ангидрида, смесь выдерживали 16 ч при 20°C , упаривали с метанолом, высушивали в вакууме и хроматографировали на колонке Lichrosorb RP-8 в воде (рис. 1).

Ферментативный гидролиз олигосахаридов. А. К 5 нмоль олигосахарида в 20 мкл 0,05 М Na-цитратного буфера, pH 4, 5, приливали 1 мкл суспензии β -N-ацетилглюкозаминидазы (20 МЕ/мл), смесь выдерживали 20 ч при 37°C , хроматографировали на колонке Lichrosorb RP-8 в воде и собирали фракцию, выходящую на том же месте, что и исходный олигосахарид. Эту фракцию упаривали, остаток растворяли в 20 мкл 75% метанола и хроматографировали на колонке Alltech NH_2 . И в этом случае продукт не отличался по хроматографической подвижности от исходного олигосахарида. Продукт гидролизovali и определяли моносахаридный состав (таблица).

Б. 10 нмоль ОС-16 обрабатывали β -N-ацетилглюкозаминидазой как описано выше, реакционную смесь хроматографировали на колонке с TSK-40, собирали фракцию в зоне моносахаридов (0,8—1 объем колонки), упаривали, остаток гидролизovali и анализировали на анализаторе углеводов.

Дегградация олигосахаридов по Смиту. 50 нмоль олигосахарида в 50 мкл 0,05 М NaIO_4 выдерживали ~ 24 ч в темноте при 20°C , прибавляли порциями 2—3 мг NaBH_4 , смесь выдерживали 3 ч при 20°C , избыток NaBH_4 разрушали, прибавляя CH_3COOH , и смесь деионизовали, пропуская через колонки (~ 1 —2 мл) с $\text{AG1} \times 8$ (CH_3COO^-) и $\text{AG50} \times 2$ (H^+); элюция водой. Раствор упаривали, остаток обрабатывали метанолом, подкисленным CH_3COOH , и упаривали (эту операцию повторяли 3 раза). Продукт растворяли в 100 мкл 0,2 М CF_3COOH , раствор выдерживали 16 ч при 20°C , упаривали, высушивали в вакууме и остаток хроматографировали на колонке с TSK-40 в воде (рис. 2Б). Состав полученных фракций (13б, 19б) после гидролиза 3 М CF_3COOH приведен в таблице.

Аналогично проводили повторную дегградацию фрагмента 13б.

Ацетоллиз олигосахаридов. 20 нмоль высушенного в вакууме олигосахарида растворяли в 40 мкл смеси уксусный ангидрид — пиридин (1 : 1), раствор выдерживали 16 ч при 20°C , упаривали с толуолом и метанолом

и высушивали в вакууме. Образец растворяли в 50 мкл смеси уксусная кислота — уксусный ангидрид — H_2SO_4 (10 : 10 : 1), раствор выдерживали 6 ч при 30° С [12], деионизовали, пропуская через колонку (~1 мл) с AG1 × 8 (CH_3COO^-) и элюируя продукт 70% метанолом. Элюат упаривали, продукт высушивали в вакууме, приливали 100 мкл метанола и 10 мкл триэтиламина, раствор выдерживали 16 ч при 5° С и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с TSK-40 в воде, собирали фракции как показано на рис. 2Г, которые гидролизовали 3 М CF_3COOH (100°С, 6 ч) и определяли в них содержание моносахаридов (таблица).

ЛИТЕРАТУРА

1. Schwarz R. T., Schmidt M. T. G., Anwer U., Klenk H.-D. J. Virol., 1977, v. 23, № 1, p. 217—226.
2. Collins J. K., Knight C. A. J. Virol., 1978, v. 26, № 2, p. 457—467.
3. Nakamura K., Compans R. W. Virology, 1979, v. 95, № 1, p. 8—23.
4. Ward C. W., Dopheide T. A. Biochem. J., 1981, v. 193, № 3, p. 953—962.
5. Matsumoto A., Yoshima H., Kobata A. Biochemistry, 1983, v. 22, № 1, p. 188—196.
6. Арбатский Н. П., Желтова А. О., Лихошерстов Л. М., Сенченкова С. Н., Юртов Д. В., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. Биооргани. химия, 1985, т. 11, № 6, с. 837—844.
7. Арбатский Н. П., Шашков А. С., Желтова А. О., Юртов Д. В., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. Биооргани. химия, 1985, т. 11, № 11, с. 1556—1561.
8. Derevitskaya V. A., Arbatsky N. P., Kochetkov N. K. Eur. J. Biochem., 1978, v. 86, № 2, p. 423—437.
9. Kochetkov N. K., Derevitskaya V. A., Arbatsky N. P. Eur. J. Biochem., 1976, v. 67, № 1, p. 129—136.
10. Деревицкая В. А., Арбатский Н. П., Кочетков Н. К. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1975, № 6, с. 1411—1415.
11. Sharon N., Lis G. The Proteins. 3rd ed. V. 5/Eds Neurath H., Mill P. L. N. Y. — L.: Acad. Press, 1982, p. 1—144.
12. Diabate S., Geyer R., Stirm S. Eur. J. Biochem., 1984, v. 139, № 2, p. 329—336.
13. Hsieh P., Rosner M. R., Robbins P. W. J. Biol. Chem., 1983, v. 258, № 4, p. 2548—2554.
14. Niemann H., Dabrowski J., Dabrowski U., Geyer R., Keil W., Klenk H.-D., Stirm S. Eur. J. Biochem., 1985, v. 146, № 2, p. 523—532.
15. Hunt L. A. Arch. Biochem. and Biophys., 1983, v. 226, № 1, p. 347—356.
16. Diabate S., Geyer R., Stirm S. Arch. Virol., 1983, v. 76, № 4, p. 321—333.
17. Schluter M., Linder D., Geyer R. Carbohydr. Res., 1985, v. 138, № 2, p. 305—314.
18. Sinner M., Puls J. J. Chromatogr., 1978, v. 156, № 1, p. 197—204.

Поступила в редакцию
7.1.1986

THE STRUCTURE OF MAJOR COMPLEX CARBOHYDRATE CHAINS OF INFLUENZA VIRUS A/LENINGRAD/385/80 (H3N2) HEMAGGLUTININ

ARBATSKY N. P., ZHELTOVA A. O., YURTOV D. V., DEREVITSKAYA V. A.,
KOCHETKOV N. K.

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

The structure of four oligosaccharides which are the main carbohydrate chains of hemagglutinin of influenza virus A/Leningrad/385/80 (H3N2) has been elucidated. It was shown by means of enzymatic and mild acid hydrolysis, Smith degradation and acetolysis that the oligosaccharides have very similar structures (noncomplete triantennary) and differ from each other only in the number (0, 1 or 2) and position of fucose residues. The peculiarities of glycosylation of H3 hemagglutinin from different strains of influenza virus were discussed.